

**Die Wirkung
cancerogener und östrogenen Stoffe
auf Pflanzen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

Alfred Blochinger

aus München

Juli 1960

Wien

Springer-Verlag

1961

Sonderdruck aus Protoplasma, Band LIV, Heft 1, 1961



Referent: Professor Dr. A. Barthelmess

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 7. 1960

Die Wirkung cancerogener und östrogenen Stoffe auf Pflanzen*

Von

Alfred Blochinger, München

Mit 53 Textabbildungen und 5 Figuren

(Eingegangen am 22. September 1960)

Wirkung cancerogener Stoffe Einleitung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, daß über cancerogene Wirkung der in zahllosen Tierexperimenten als aktiv erwiesenen Stoffe bei Pflanzen überraschend wenig bekannt geworden ist.

In der eingesehenen Literatur waren nur die folgenden Arbeiten aufzufinden:

R. Bauch (1942) erhielt nach Behandlung von Bierhefe mit 3,4-Benzpyren und 1,2;5,6-Dibenzanthrazen Gigasformen (z. T. erblich konstante), die eine kräftige Gärung aufwiesen. Die Erzeugung solcher Gigasformen ist aber nicht auf Cancerogene beschränkt, sondern sie gelingt auch mit anderen Stoffen; außerdem ist fraglich, ob der Gigascharakter überhaupt eine Beziehung zum „Krebs-Zustand“ aufweist.

M. Levine (1939) erzielte mit o-Aminoazotoluol an *Bryophyllum daigremontanum* crown gall-artige Tumoren (Zahlenangaben fehlen!). Die Untersuchung des ausführlicher beschriebenen Tumors erfolgte nur makroskopisch, es wurde also keine Kontrolle auf Bakterien durchgeführt. Daher darf die Richtigkeit der aus den Versuchsergebnissen gezogenen Schlüsse in Frage gestellt werden.

I. Kisser und L. Lindenberg (1941) erhielten mit Hartpech, Teeröl und 1,2-Benzpyren in Pastenversuchen an *Sambucus nigra*, *Pelargonium zonale*, *Nicotiana glauca* und *Solanum lycopersicum* außer Blattschädigungen eine Beschleunigung und Intensivierung der Holz- und Kallusbildung. Maligne Tumoren waren nicht aufgetreten.

H. Weyland (1948/49) untersuchte an vier verschiedenen Pflanzen die durch o-Aminoazotoluol und 3,4-Benzpyren erzeugten Mitosestörungen und Entwicklungsdefekte. Er fand in der ersten Phase der Behandlung eine starke Beschleunigung der Mitose, dann unspezifische Kernschädigungen; dasselbe gilt für die Östrogene Cyren B (Stilböstroldipropionat) und Östron. Carcinogene bewirken nach seinen

* Diese Arbeit wurde als Dissertation der Universität München angenommen.

Befunden Verwachsungen und Degenerationen, besonders an den Blütenorganen sowie Größenschwankungen von Zellen und Zellkernen. Angaben über eine maligne Entartung der Zellen liegen nicht vor.

H. Nothdurft (1949) erhielt mit 3,4-Benzpyren und 7-Methylcholanthren an Tomaten mütterlich vererbte Abänderungen an Plastiden, Früchten usw. Eine ausreichende Analyse zur Klärung von Art und Ort der Erbänderung wurde nicht durchgeführt; die Effekte können auch kaum als Teilerscheinungen einer Cancrisierung aufgefaßt werden.

J. Reinert (1952) kultivierte Prothallien von *Stenochlaena palustris* (Farn) in wässrigen Lösungen von 3,4-Benzpyren und beobachtete das Flächenwachstum. Bei einer Konzentration von 1 : 1250.000 Bp./Nährlösung stieg das Wachstum über den Wert der Kontrolle an, ebenso verhielt sich der Gehalt des Pflanzengewebes an IES. Verwendete er eine Konzentration von 1 : 500.000, so wurde das Wachstum gehemmt und der Gehalt der Gewebe an IES sank unter den Kontrollwert ab. Eine maligne Entartung der Zellen trat nicht ein. Das krebserzeugende Benzpyren soll nach Ansicht des Autors in die Vorgänge eingreifen, welche den Wuchsstoffhaushalt kontrollieren. M.E. fehlen aber in dieser Arbeit Parallelversuche mit mehreren carcinogenen Stoffen verschiedener Grundkonstitution; ferner ist die Frage nicht berücksichtigt, ob die beobachteten Effekte lediglich auf cancerogene Stoffe beschränkt sind oder ob sie auch durch nicht-krebserzeugende Substanzen hervorgerufen werden können.

P. Michaelis (1949) kündigt (auf S. 229) eine ausführliche Untersuchung der Wirkung cancerogener Stoffe auf seine hierfür in gewisser Hinsicht besonders günstigen Objekte (*Epilobium*-Bastarde) an. Ein Bericht über diesbezügliche Ergebnisse war aber in der eingesehenen Literatur nicht aufzufinden.

Bei der Aktualität des Krebsproblems ist es so gut wie sicher, daß noch weit mehr Versuche mit cancerogenen Stoffen an Pflanzen unternommen wurden. Ihre Ergebnisse müssen entweder völlig negativ gewesen sein oder so unspezifisch, daß auf eine Veröffentlichung verzichtet wurde. In gleicher Richtung deutet die Tatsache, daß seit vielen Jahrzehnten unbeabsichtigte Experimente größten Umfanges, ebenfalls ohne positives Ergebnis laufen, nämlich die Anwendung von teer- und arsenhaltigen Mitteln im Pflanzenschutz. Besonders instruktiv ist in dieser Beziehung der mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Arsen zurückzuführende „Winzerkrebs“ (F. Roth 1956): Während der Arsengehalt des Mostes noch genügt, um bei vielen Winzern nach chronischer Inkorporierung multiple Tumoren in großer Zahl zu erzeugen, riefen die Pflanzenschutzmittel (die Quellen des Arsens im Most) an den Weinstöcken trotz jahrelang wiederholter (chronischer!) Anwendung keinerlei tumoröse Gewebswucherungen hervor. Auch bei der häufigen Verwendung teerhaltiger Lösungen zur fäulnishemmenden Behandlung frischer Wunden an Bäumen müßte eine cancerogene Wirkung aufgefallen sein, um so mehr, als hier außerdem noch die Einwirkung der Mittel anfangs zeitlich zusammenfällt mit zellteilungsstimulierendem Verwundungsreiz.

Eine zweite Deutungsmöglichkeit für das Fehlen positiver Berichte wäre die **ungeeignete Methodik**. Schon beim Eindringen in den Pflanzenkörper — sei es durch die unverletzte Epidermis der oberirdischen Organe, durch das intakte Wurzelsystem, von Wunden aus diffundierend oder von Stengel-

schnittflächen aus mit dem Transpirationsstrom aufsteigend — finden die Stoffe hier andere Permeationsverhältnisse vor als beim Tier; insbesondere die geringe Wasserlöslichkeit vieler cancerogener Stoffe macht hier Schwierigkeiten.

Ferner ist aus zahlreichen Tierversuchen bekannt, daß die Giftigkeit eines Stoffes — und dementsprechend die angewandte Konzentration — nicht zu groß sein darf; das durchtränkte Gewebe darf nicht sehr schwer geschädigt werden, denn es muß ihm eine Umstellung in den „Krebszustand“ und eine erfolgreiche Behauptung gegenüber dem gesunden Gewebe noch ermöglicht werden. Hohe Konzentration, wie sie häufig angewendet wird, um „sicher“ ein positives Ergebnis zu erhalten, kann hier gerade den umgekehrten „Erfolg“ haben.

Ebenso ist aus den Tierversuchen bekannt, daß zwischen dem Beginn der Anwendung eines Mittels und dem Einsetzen einer Hyperplasie eine — insbesondere bei niederen Konzentrationen — oft jahrelange Latenzzeit verstreicht, während welcher der Stoff scheinbar völlig wirkungslos ist. Auch diese Möglichkeit dürfte bei Experimenten sehr oft nicht beachtet worden sein.

Schließlich ist auch noch damit zu rechnen, daß es bei den Pflanzen — wie bei den Tieren — gut und schlecht reagierende Arten gibt und die bisher benutzten Objekte zufällig alle zu den letzteren gehören.

Eine dritte Deutungsmöglichkeit wäre, daß die am Tier hochaktiven Stoffe bei Pflanzen mangels gleichartiger intrazellulärer Reaktionspartner tatsächlich keinen Krebs erzeugen können, daß aber Stoffe von anderem Typus dazu imstande sind. Als solche kämen vielleicht die vielerlei, das Teilungs- und Streckungswachstum stimulierenden Wuchsstoffe in Frage, sowohl die „unnatürlichen“, wie die natürlichen, von Bakterien, Pilzen und Insekten abgesonderten Stoffe (Abb. 42 und 43).

Damit sind die zwei entscheidenden Fragen aufgeworfen:

1. Ist das, was bei Pflanzen als „Krebs“ bezeichnet wird, überhaupt dem tierischen Krebs homolog? Nur in diesem Fall dürfte erwartet werden, daß sich an Pflanzen mit den gleichen Mitteln wie am Tier Tumoren erzeugen lassen.

2. Sind die Veränderungen, die sich bei der Cancerisierung einer Tierzelle abspielen, von solcher Art, daß sie bei Pflanzen gar nicht auftreten können?

Die Homologiefrage ist derzeit noch völlig offen; die Meinungen der Autoren gehen hier weit auseinander. Immerhin ist unverkennbar, daß die allgemeinsten und wichtigsten Kennzeichen tierischer Tumoren auch auf die Crowngalls und die Tabaktumoren zutreffen:

Aufhebung der entwicklungsphysiologischen Koordination und hohe Teilungsaktivität,

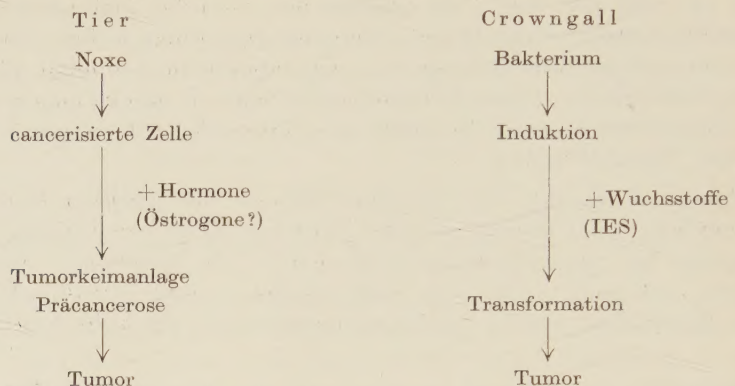
hohe und stärker proteotrophe Proteinsynthese,

verringerte Gewebe- und Zelldifferenzierung,

Reproduktion des „Krebs“zustandes mittels Teilungswachstums in Abwesenheit des induzierenden Agens,

zahlreiche Mitoseanomalien und oft abweichende Chromosomenzahlen.

Beachtenswert ist auch die Parallele im zeitlichen Ablauf der Geschwulstentstehung bei Tier und Pflanze (Crowngall):



Dennoch können alle diese auffallenden Parallelen auch im Sinne einer Analogie aufgefaßt werden, da an Pflanzen der Alterskrebs und an Tieren bakterieller Krebs unbekannt ist.

Um die zweite Frage prüfen zu können, ob die Pflanzenzelle ihrer Organisation gemäß überhaupt in der Lage ist, die für das Tier cancerogenen Noxen mit einer gleichartigen Reaktion zu beantworten, ist es notwendig, die Vorgänge in der Zelle, die als maßgeblich für den tierischen Cancerisierungsprozeß angesehen werden können, genauer zu betrachten. Die „innere Antwort“ der Tierzelle auf eine cancerogene Noxe ist heute noch unbekannt, die Anschauungen gehen daher stark auseinander und tragen weitgehend hypothetischen Charakter.

1. **Die Mutationstheorie** wurde von K. H. Bauer (1949) aufgestellt. Der Autor sagt: „Krebs ist eine somatische Mutation.“ Er legt kein Organell fest, das bei der Cancerisierung mutieren soll, sondern spricht nur von einem „Steuerungszentrum“, an dem sich die Veränderung abspielen soll.

Th. Boveri (1912) kam auf Grund seiner Versuche mit polysperm befruchteten Seeigelleiern zu der Vermutung, daß ein abnormaler Chromatinbestand in der Zelle die Ursache der Krebsentstehung sein könnte.

C. D. Darlington (1948) glaubt, daß genetisch wirksame cytoplasmatische Bestandteile, die „Plasmagene“ unter dem Einfluß von Cancerogenen zu Proviren mutieren. Die Stoffwechseleinflüsse dieser Proviren und ihre weitere identische Reproduktion würden dann die betreffende Zelle samt ihren Deszendenten zur Krebszelle machen.

Auch H. Nothdurft (1948) kam durch seine Versuche zu der Anschauung, daß der „Ort“ der Mutation im Cytoplasma liegen müsse.

H. Breider (1951) sucht die Ursache für eine Cancerisierung in einer Inaktivierung des Genoms (vermutlich meint der Autor nur diejenigen Gene, welche eine Spezialisierung der Zelle einleiten?), die durch eine Abänderung des cytoplasmatischen Zustandes bedingt ist.

schen Zustandes veranlaßt sein soll. Die plasmatische Abänderung selbst soll durch die cancerogene Noxe verursacht werden.

P. Michaelis (1948, 1949) ist der Ansicht, daß unter der Einwirkung der Cancerogene das quantitative Organellverhältnis im extranukleären Idioplasma der Zelle so verschoben wird, daß eine physiologische Disharmonie entsteht.

2. In der **Krebshypothese** von O. Warburg (1959) wird die **aerobe Glycolyse** als ein Charakteristikum für cancerisierte Zellen angegeben; dabei soll zuerst die aerobe Glycolyse und dann erst die Malignität auftreten. Über Verlust, strukturelle Veränderung oder Umkombination von Zellorganellen äußert sich der Autor in letzter Zeit nicht mehr. In einer früheren Abhandlung (1955) vertrat der Autor die Ansicht, daß mit der Atmungsverminderung ein „Weniger an Struktur“ (welcher wird nicht gesagt) verbunden sei.

A. Graffi wies eine Speicherung von cancerogenen Kohlenwasserstoffen in den Mitochondrien der Zellen von Hefe (1959) und der Mäuseepidermis (1940) nach. Deshalb sucht der Autor den „Ort“ der Veränderung in den Mitochondrien, die Veränderung selbst soll „mutationsähnlich“ sein (1953).

3. H. v. Euler, F. Köbl und O. Schmidt (1941) sehen als innere Ursache für die Cancerisierung tierischer Zellen den Einbau von **d-Aminosäuren** an (der Befund selbst ist aber umstritten — J. A. Miller 1950).

4. Die Hypothese der **Keimausschaltung** wurde von Conheim aufgestellt. Ihr zufolge sollen embryonale Inseln (Relikte) in ausdifferenziertem Gewebe Ursache und Ausgangsorte für eine Entstehung von Tumoren darstellen. W. Ribbert (1911) erweiterte diese Hypothese und sieht den Ausgangspunkt für die Geschwulstbildung in einer (z. T.) postnatalen Gewebeverlagerung.

Die hier anhand der wichtigsten „Krebshypothesen“ erläuterten Vorstellungen über die Natur des Primärvorganges bei der Cancerisierung und das Wesen der tierischen Krebszelle postulieren Ereignisse wie Mutationen im nukleären und extranukleären Erbgut, selektive Veränderungen des Mischungsverhältnisses extranukleärer Organelle, Disharmonien zwischen Genom und Plasmon, permanente Veränderungen in der Größe der Atmung, Entdifferenzierung von Zellen und Geweben, Enthemmung des Teilungswachstums. Als Orte der primären irreversiblen Veränderung werden vor allem der Kern und die Mitochondrien genannt. Wieweit diese Vorstellungen der Wirklichkeit entsprechen, ist zwar noch immer nicht bekannt. Für die dieser Arbeit zugrunde liegende Vorstellung ist es aber wichtig, daß keine dieser Hypothesen einen **Vorgang** oder Zustand als Ursache nennt, **der nicht auch in einer Pflanzenzelle möglich wäre.**

Diese Feststellung wird noch unterstrichen durch die Tatsache, daß ja bei Pflanzen wirklich Gewebswucherungen vorkommen, die nach ihrem Aussehen von jeher als „Krebs“ bezeichnet wurden und von denen durch sterile Transplantation und Gewebekultur sogar eine gewisse Konstanz und Autonomie nachgewiesen wurde. Weiter kommt hinzu, daß auch im Gefolge von Bestrahlung bei Pflanzen äußerlich ähnliche Wucherungen aufgetreten (E. Stein 1942, L. A. Schairer et al. 1959) und daß auch virus-induzierte Hyperplasien (L. M. Black 1952) bekannt sind. Um so erstaunlicher bleibt die Unwirksamkeit von chemischen Cancerogenen an der Pflanze, da diese Substanzen im Tierversuch doch so hochgradig und spezifisch aktiv sind.

Experimenteller Teil

Auswahl von Objekten und Methoden

Bei der Auswahl der Objekte und Methoden für die vorliegenden Untersuchungen wurden die oben besprochenen möglichen Ursachen für die bisherigen spärlichen und meist negativen Ergebnisse besonders berücksichtigt.

Da der Grund für ein negatives Versuchsergebnis u. a. auch in einer ungeeigneten Methodik liegen könnte, wurden folgende Verbesserungen eingeführt:

1. Die wegen der äußerst geringen Wasserlöslichkeit, insbesondere der Kohlenwasserstoffe, bisher vielleicht zu geringe Konzentration wurde durch geeignete Lösungsvermittler erhöht.
2. Bei stärker giftigen Stoffen wurde darauf gesehen, eine Konzentration anzuwenden, die auch bei wochenlanger Behandlung noch vertragen wird, um die im Tierversuche so besonders wichtige chronische Einwirkung prüfen zu können.
3. Da mit der Möglichkeit einer langen Latenzzeit gerechnet werden mußte, wurden Behandlungs- und Beobachtungsdauer solange als möglich ausgedehnt.
4. Im Tierversuch sind außer der Umstimmung der Zellen auch gute Realisationsbedingungen für die Tumorentwicklung nötig, z. B. traumatische Reize, Sauerstoffmangel, Hilfsstoffe wie Crotonöl. Da es durchaus möglich ist, daß das Fehlen entsprechender, aber noch unbekannter, Voraussetzungen bei Pflanzen nur zu Teilerscheinungen der Cancerogenese führt, die bisher übersehen oder als solche nicht erkannt wurden. Nach Möglichkeit sind wenigstens Verwundungsreize und Sauerstoffmangel angewandt worden.

Um im Falle eines positiven Resultats sicherer zu sein, daß eine ursächliche Beziehung zur cancerogenen Wirkung auf die Tierzelle besteht, wurde zum Vergleich auch das im Tierversuch nicht cancerogene Azobenzol, sowie das im Pflanzenversuch bisher nicht berücksichtigte Arsen einbezogen. Auf Methylcholanthren mußte wegen des hohen Preises leider verzichtet werden.

Alle obigen Gesichtspunkte waren maßgebend für die Auswahl der Objekte. Zur Nachprüfung der wenigen älteren Befunde wurden möglichst die gleichen Arten herangezogen; die neu eingeführten niederen Pflanzen sollten speziell dem Nachweis von Teilprozessen der Cancerogenese dienen. Die näheren Gründe für die Wahl sind im Folgenden zu Beginn der Besprechung jeder einzelnen Versuchsgruppe genannt.

Oospora lactis

Dieser in Kultur sehr leicht zu haltende Pilz wurde in erster Linie herangezogen, um die Lokalisation der cancerogenen Stoffe in den Zellen und das Verhalten der Mitochondrien direkt mikroskopisch zu beobachten. Er bot ferner die Möglichkeit diese Stoffe beliebig lange unter Sauerstoffmangel einwirken zu lassen (siehe Warburgsche Hypothese); mit grünen Versuchspflanzen wäre dies nur im Dunkeln und für relativ kurze Zeit zu erreichen.

Material und Methodik:

Getestet wurden die Stoffe Azobenzol (AB)¹, p-Aminoazobenzol (AAB), p-Dimethylaminoazobenzol (DAB), o-Aminoazotoluol (AT), arsenige Säure (AS) sowie 3, 4-Benzpyren (BP). Der Pilz wurde auf einem Nährboden nach S a b o u r a u d in Reagenzgläsern herangezogen.

Die Kultivierung während der Behandlung mit cancerogenen Stoffen erfolgte in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen mit einem Volumen von 100 ml. Es wurden pro Stoff 40 ml Flüssigkeit verwendet, die auf zwei Kolben aufgeteilt waren. Als Nährmedium diente eine wässrige Lösung von 5 g Pepton und 10 g Glukose auf 1000 ml Leitungswasser, die nach dem üblichen Verfahren hergestellt wurde; sie enthielt jedoch kein Agar. Die zu testenden Stoffe wurden erst vor dem Sterilisieren zugesetzt. Da diese basischen bzw. schwach sauren Charakter besitzen, wurden die Kölbchen zuerst kurze Zeit (etwa 20 Min.) auf 100° erhitzt, dann rasch in Wasser gekühlt und der Inhalt auf pH 5,8 eingestellt. Anschließend wurde bei 120° 20 Min. sterilisiert. 24 Std. nach dem Erkalten wurde das pH wiederum nachkontrolliert und, falls nötig, korrigiert. Nun wurden die Pilze eingimpft und die Kolben bei 27° bebrütet. Die Bestimmung der Menge an gelöster Substanz erfolgte durch Kolorimetrie (mit dem gleichen Verfahren wurde auch in den übrigen Versuchen der vorliegenden Arbeit die Konzentration an gelöster Substanz bestimmt) — außer bei AS, dessen Lösungsgrenze in Wasser so hoch liegt, daß die gebotene Substanzmenge als gelöst betrachtet werden kann.

Flüssiges Kulturmedium wurde deshalb gewählt, weil hier die Stoffaufnahme allseitig erfolgen kann und tägliches Umschütteln des Inhaltes eine gute Durchmischung bewirkt, was besonders wichtig bei einer langen Beobachtungsdauer ist (12. V. bis 11. VI. 1959). Die erste Probe wurde nach vier Tagen (am 16. V.) entnommen, und zwar je sechs Pilzflocken pro Kölbchen. Die weitere Untersuchung erfolgte jeden dritten Tag, wobei die Anzahl der Pilzflocken allmählich bis zu 20 gesteigert werden konnte. Zur Färbung der Mitochondrien diente eine fünfstufige Konzentrationsreihe von 0,2 bis 0,001 gr.% Janusgrün B der Firma Dr. G r ü b l e r u. Co., Leipzig. Die Verteilung der Stoffe in der Zelle wurde, soweit möglich, mit dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt.

Ergebnisse:

Der Schwerpunkt der Untersuchung wurde auf die **Mitochondrien** verlegt.

AS. Das cytologische Bild von *Oospora lactis* nach Behandlung mit 10 mg/l zeigt Abb. 1 f. Die Mitochondrien sind in allen Zellen der jüngeren Mycelpartien (obere Zelle der Abbildung) nur mäßig aufgebläht, stärker dagegen in den älteren Mycelteilen, etwa 5. bis 10. Zelle von der Spitze; dort weisen sie auch eine unregelmäßigere Lagerung auf (untere Zelle). Die Färbbarkeit der Mitochondrien mit Janusgrün ist vermindert, die Permeabilität der Zellen für Janusgrün erhöht. Die Anzahl der Fetttropfen ist im Vergleich zur Kontrolle vor allem in den älteren Mycelteilen gesenkt.

AB. In 0,25 mg/l treten nach 25 Tagen Behandlung deutliche Involutionsformen an den Mitochondrien der Spitzenzelle auf, wie aus Abb. 1 d zu

¹ Im folgenden werden nur noch die hinter den jeweiligen Stoffen in Klammern stehenden Abkürzungen verwendet.

entnehmen ist. Die Permeabilität dieser jungen Zellen für Janusgrün ist sehr stark erhöht; es tritt leicht Überfärbung ein, so daß sich das Cytoplasma blau färbt, insbesondere im vorderen Bereich der Spitzenzellen. Fetttropfen fehlen im ganzen Mycel fast völlig.

AAB wirkte in einer gesättigten Lösung von 9,1 mg/l toxisch. In einem Viertel dieser Konzentration nahmen die Mitochondrien rasch eine aufgeblähte Gestalt an (Abb. 1 g) und ihre Färbbarkeit mit Janusgrün war vermindert; die Permeabilität der Zelle für Janusgrün war wiederum erhöht. Das Hyaloplasma war optisch bedeutend weniger dicht.

In AB degenerieren also die Mitochondrien schon in sehr „jungen“ Zellpartien, AS und AAB wirken dagegen bedeutend schwächer.

AT (Abb. 1 e). Die Mitochondrien bleiben stets gut färbbar, erst in sehr „alten“ Mycelteilen nehmen sie einen etwas unregelmäßigen Umriss an. Hier treten auch Involutionsformen bei einer Konzentration von 40 mg/l auf, die aber dennoch gut färbbar sind (in der Abb. die beiden unteren Zellen) und an Zahl weit hinter den mit AB erzeugten zurückbleiben. Die Mitochondrien sind meist von normaler Länge und weisen im Gegensatz zu denen nach Anwendung von AS auch in den spitzenfernen Mycelteilen eine normale Anordnung auf, solange sie noch eine regelmäßige Gestalt besitzen. Fetttropfen sind häufig, meist von regelmäßiger Gestalt und durch das gelöste Agens gelb gefärbt.

DAB. In 1,2 mg/l sind die Mitochondrien gut färbbar; ihre Anordnung ist — wie aus Abb. 1 c hervorgeht — normal. Sie sind in Längsrichtung gestreckt, aber diese Abweichung vom Normalverhalten tritt viel häufiger ein, als bei den bisher besprochenen Stoffen. Die Fetttropfen sind zahlreich, aber in der Größe etwas reduziert; oft weisen die kleinsten eine unregelmäßige Gestalt auf.

BP bietet in einer Konzentration von etwa 0,008 mg/l das gleiche Bild. In Abb. 1 b ist die Durchschnürung der übermäßig lange gestreckten Mitochondrien dargestellt.

Soweit die Stoffe fluoreszieren — alle außer AS — wurde ihre **Verteilung in der Zelle** mit dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt.

Mit **BP** weisen die Mitochondrien und Fetttropfen eine sehr deutliche, weißblaue Fluoreszenz auf.

DAB zeigt in den Fetttropfen und Mitochondrien eine violettblaue Fluoreszenz.

AT fluoresziert blaugrün bis violett. Diese Farben zeigen vor allem die Fetttropfen, Spuren davon waren in der Membran, weniger im Hyaloplasma zu erkennen. Die Konzentration dieses Stoffes war an der Fluoreszenz gemessen in den lebenden Mitochondrien selbst nur mäßig.

AAB war in der Hauptsache (auf Grund der Fluoreszenz) in der Zellmembran lokalisiert. Die Fetttropfen fluoreszierten nur mäßig, noch weniger die Mitochondrien; doch war der Stoff in diesen Zellorganellen noch in höherer Konzentration vertreten als im Hyaloplasma.

In **AB** zeigte sich infolge der niederen Konzentration bei der Behand-

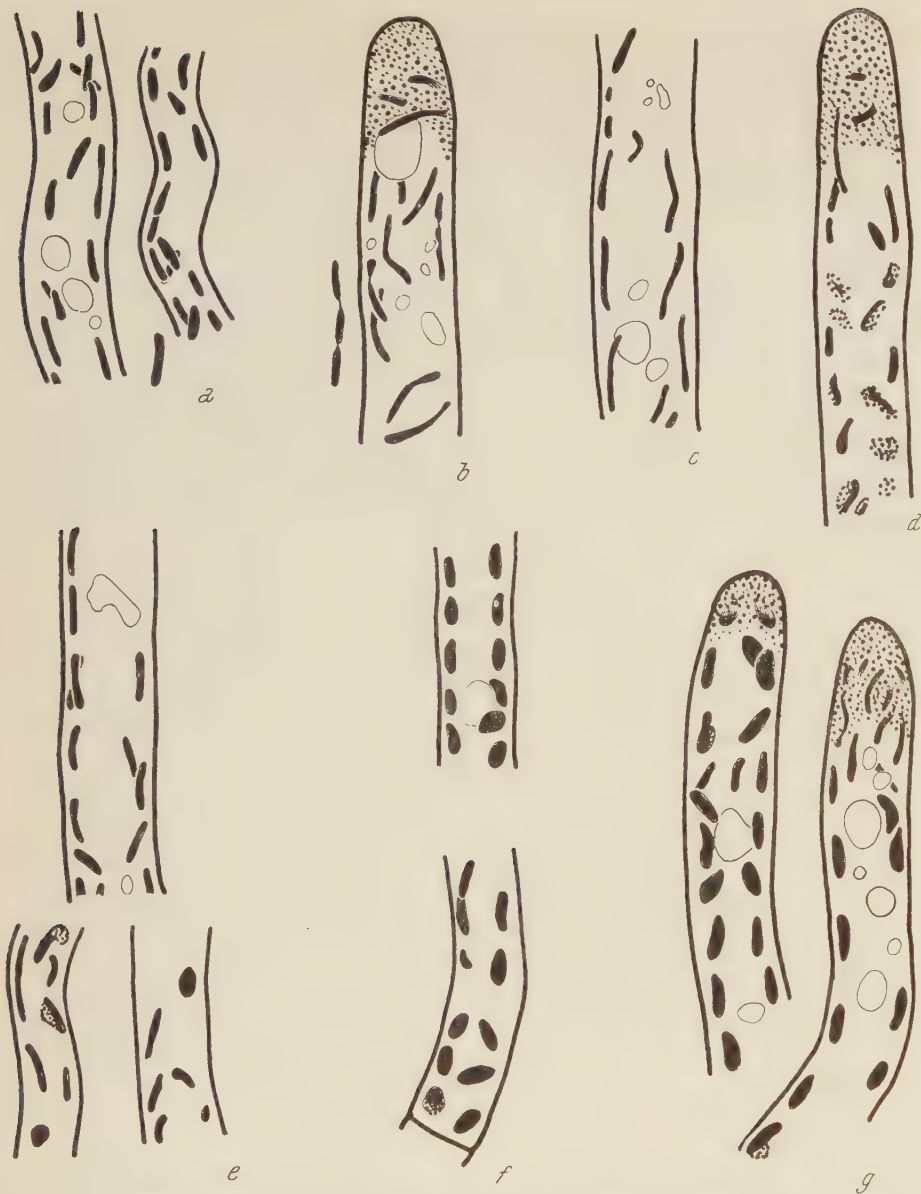


Abb. 1. Mitochondrien (schwarz) und Fetttropfen (weiß) in vegetativen Zellen des Mycel von *Oospora lactis* nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen. *a* Kontrolle, links spitzennahe, rechts spitzenferne Zelle. *b* Spitzenzelle nach Behandlung mit Benzpyren; die Mitochondrien sind gestreckt und vermehren sich lebhaft. *c* Spitzennahe Zelle nach Behandlung mit p-Dimethylaminoazobenzol; Mitochondrien gestreckt. *d* Spitzenzelle nach Behandlung mit Azobenzol; es treten an den Mitochondrien Involutionsformen auf. *e* Behandlung mit o-Aminoazotoluol; obere Zelle spitzennah, die beiden unteren spitzenfern (hier vereinzelt Involutionsformen). *f* Behandlung mit arseniger Säure; die obere Zelle spitzennah, die untere spitzenfern. *g* Zwei Spitzenzellen mit $\frac{1}{4}$ -gesättigter Lösung von p-Aminoazobenzol behandelt.

lung nur eine schwache Fluoreszenz, derzufolge diese Substanz anscheinend nur von den Fetttropfen und Mitochondrien aufgenommen wird.

Da die Pilze nur sehr kleine Zellkerne aufweisen, deren Identifizierung sehr schwierig ist, wurde auf eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Verhaltens der Kerne gegenüber den cancerogenen Substanzen verzichtet.

Diskussion:

Aus den vorstehenden Angaben ist zu entnehmen, daß die Verteilung in der Zelle — zumindest der fluoreszierenden Stoffe — ihren physikalischen Eigenschaften entspricht: je lipophiler der Stoff, desto höher seine Speicherung in den Mitochondrien und Fetttropfen. Trotz dieser selektiven Speicherung ist die Giftwirkung auf die Zellbestandteile bei sämtlichen hier geprüften cancerogenen Stoffen relativ gering, zum Unterschied von dem nicht-cancerogenen stark giftigen AB. Der Unterschied prägt sich sowohl im Wachstum wie im Zustand der Zellorganelle, vor allem aber der Mitochondrien aus.

Saccharomyces oviformis

Dieser Organismus, der an sich die gleichen methodischen Vorteile besitzt wie *Oospora*, wurde wegen einiger interessanter Befunde herangezogen, von denen ein Zusammenhang mit dem zu erwartenden Problem vermutet werden konnte.

O. Warburg (1955) berichtet, daß cancerisierte Zellen aerobe Glycolyse zeigen. Nun hat aber R. Bauch (1942) an Bierhefe durch BP *Gigas*-formen erzeugt, die z. T. erblich konstant geblieben sind und B. Ephrussi u. Mitarb. (1949, 1950 und 1956) an Bäckerhefe mit Trypaflavin in sehr hoher Ausbeute eine ebenfalls z. T. erblich konstante Mutation, die er *Kleinkolonie* benannte. Die beiden Hefeformen zeichnen sich dadurch von der Normalform aus, daß ihre aerobe Restgärung bedeutend erhöht ist.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, daß mit den krebserzeugenden Stoffen bei Hefen möglicherweise eine ähnliche oder gar gleiche Abänderung zu erzielen sei, wie sie für die tierischen Krebszellen typisch zu sein scheint.

Material und Methodik:

Da es für die vorliegenden Versuche aus verschiedenen Gründen wünschenswert erschien, daß die Hefestämme einen hohen Alkoholgehalt ertragen können, wurden zwei besonders hochvergärende Weinhefestämme² verwendet.

Als Nährboden für die Hefestämme wurde eine 3%ige Lösung des Extraktes „Biomalz“ mit einem geringen Zusatz von Dörrobstaft verwendet. Für festen Nährboden wurden noch 2% Agar zugesetzt. Zur Untersuchung kamen die Stoffe AT und

² Die Hefestämme wurden freundlicherweise von Prof. L. Genevois, Bordeaux, zur Verfügung gestellt. Sie führen in dessen Institut die Bezeichnung 88/XIII und 92/XV. Physiologische Daten, S. Domercq, Annales de Technologie (1957).

BP. Die Behandlung erfolgte in flüssigem Nährmilieu. Zu diesem Zweck wurde der Inhalt von drei Schrägröhrchen in 20 ml Nährlösung suspendiert, die bis zur Sättigung mit Cancerogen versehen war. Von BP waren 2 mg/20 ml in feinsten Verteilung enthalten. Außerdem wurde eine Kontrollreihe, die nur Nährlösung enthielt, mitverwendet. Damit die Zellen sich mit Agens vollsaugen konnten, wurden die Kölbchen mit der Lösung bei 20° über 25 Tage aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop auf ihren Gehalt an Agens untersucht. Nach Waschen der Zellen erfolgte ihre Aussaat auf Platten. Die Suspension wurde soweit verdünnt, daß etwa 50 Kolonien pro Platte entstehen konnten. Untersucht wurden jeweils 250 der kleinsten Kolonien von jedem Stoff und der Kontrolle aus jedem der beiden Hefestämme. Die Mitochondrien wurden mit Janusgrün B (Fa. Dr. Gr ü b l e r u. Co., Leipzig) bei einer Konzentration von 0,2 bis 0,01% angefärbt.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse seien an Stamm 88/XIII besprochen; der Stamm 92/XV verhielt sich genauso.



Abb. 2.

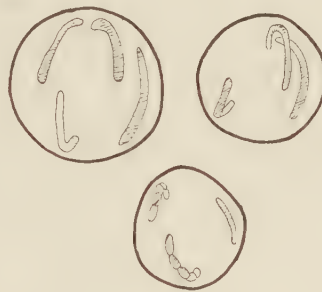


Abb. 3.

Abb. 2. Zellen von *Saccharomyces oviformis*, a Zelle aus einer Kontrollkultur, b Zelle aus einer Kontrollkultur in Teilung, c Kleinzelle nach Behandlung mit o-Aminoazotoluol (großes Exemplar).

Abb. 3. Zellen des Typs Kleinkolonie von *Oospora lactis*. Die Mitochondrien sind schwer anfärbbar, die untere Zelle zeigt den rosenkranzartigen Zerfall der langgestreckten Mitochondrien.

Zur **Identifizierung der Mitochondrien** wurde die Erscheinung benutzt, daß die Blaufärbung nach Ausschluß von Sauerstoff wieder ausbleicht. Dabei ergab sich in Übereinstimmung mit E. B a u t z und H. M a r q u a r d t (1954), daß die Zahl der Mitochondrien in einer Hefezelle eine Korrelation der Zellgröße darstellt. Auffällig ist dabei die Anordnung der Mitochondrien in der Zelle; teilweise scheint es nämlich, als ob diese Organelle wie an einem optisch nicht sichtbaren Faden aufgereiht in deutlich erkennbaren Spiralen angeordnet wären (Abb. 2).

Sobald nach einer Durchschnürung die kleine Tochterzelle die normale Größe erreicht hat, weist sie die gleiche Mitochondrienzahl wie die Mutter-

zelle auf. Die **Zahl der angefärbten Mitochondrien** wurde in der Kontrolle zu durchschnittlich 14 bestimmt, die Abb. 2 a und b gibt solche Zellen wieder. Nur ein geringer Teil der Zellen aus der Kontrolle und den behandelten Serien wies als Kolonie nach der Aussaat in der Zelle eine geringere Zahl und schwächere Färbbarkeit der Mitochondrien auf (*Kleinkolonieform* Abb. 3); dies war vor allem in den kleineren Kolonien auf den Aussaatplatten der Fall, sowohl in behandelten Kulturen als auch in den Kontrollen.

Daneben trat noch eine weitere Zellform in den Aussaatplatten (aber nicht streng kolonieweise!) auf — diese aber nur in behandelten Kulturen. Sie sei im folgenden als *Kleinzelle* bezeichnet. Ihre Zellgröße war etwas reduziert (Faktor der Lineargröße etwa 0,8) und damit ebenfalls die Zahl der Mitochondrien, welche mit Janusgrün ebenso färbbar waren und die gleiche Gestalt aufwiesen wie die der Normalzellen.

Es wurden also drei Zellformen gefunden:

1. Normalzellen (Kontrolle und behandelte Kulturen — Abb. 2 a und b).
2. *Kleinzellen* (behandelte Kulturen — Abb. 2 c).
3. *Kleinkolonieform* (Kontrolle und behandelte Kulturen — Abb. 3).

Dabei lassen sich die *Kleinkolonieformen* der behandelten Kulturen und die spontan in der Kontrolle aufgetretenen morphologisch nicht voneinander unterscheiden. Eine eventuelle genetische Konstanz der *Kleinzellen* wurde nicht verfolgt.

Über die quantitative Wirksamkeit der verwendeten Cancerogene, d. h. der Häufigkeit des Auftretens von *Kleinkolonien* und *Kleinzellen* gibt die nachfolgende Tabelle Auskunft:

Tabelle 1.

Kultur	Kleinkolonie	Kleinzellen
Kontrolle	4,4%	?
24 mg/l AT	8,0%	ca. 70%
2 mg/20 ml BP (Susp.) ...	7,6%	ca. 45%

Es trat also an der untersuchten Hefe nach Behandlung mit Cancerogenen eine geringe Erhöhung der Ausbeute an *Kleinkolonien* und eine Verminderung der durchschnittlichen Zellgröße ein (die *Kleinzellen* variieren sehr stark in der Zellgröße; ob es sich überhaupt um eine einheitliche Gruppe handelt, ist nicht genau abzugrenzen).

Die relativ geringe Erhöhung der Ausbeute an *Kleinkolonien* durch die cancerogenen Stoffe könnte ihre Ursache zwar in einer geringen Wirksamkeit derselben haben, aber unter Umständen auch darauf zurückzuführen sein, daß die von mir benützten Hefestämme zum Unterschied von den Stämmen *Ephrussis* sehr wenig zur Bildung von *Kleinkolonieformen* neigen. Deshalb wurde mit ihnen der Versuch von *Ephrussi* wiederholt.

Die Behandlungszeit in 17 mg/l **Trypaflavin** in Nährlösung bei submerser Kultur erstreckte sich über fünf Tage bei 25° im Dunkeln. Nach der Aussaat belief sich die Ausbeute an *Kleinkolonien* auf mehr als 95%.

Bei der cytomorphologischen Analyse der durch Trypaflavin erzeugten *Kleinkolonien* zeigte sich eine vollkommene Übereinstimmung mit den durch Cancerogene erzeugten oder spontan in der Kontrolle aufgetretenen Kleinkolonietypen. Die Zellen wiesen in der Regel nur 4 bis 8 Mitochondrien auf, diese sind jedoch langgestreckt, fadenförmig (Abb. 3). In einzelnen Fällen war eine rosenkranzartige Einschnürung der Gebilde zu beobachten (wobei eine Zunahme der Färbbarkeit zu bemerken war), so daß die Vermutung von E. Bautz (1955), diese Fäden seien durch Aneinanderkettung von Mitochondrien entstanden, sehr wahrscheinlich zutrifft. Im Gegensatz zu den Angaben der Autorin ist es aber bei den von mir verwendeten Hefen möglich — allerdings nur durch eine intensive Exposition in Janusgrün —, eine schwache Färbung der Mitochondrien zu erreichen. Bemerkenswerterweise fanden sich in einem Großteil der von den Aussaatplatten in Schrägröhrchen als „Reinkultur“ abgeimpften Kleinkolonieformen nach kurzer Zeit bereits wieder eine stattliche Anzahl von Normalzellen (etwa 25%), so daß damit gerechnet werden muß, daß ein Teil bei weiterer Kultur wieder in die Normalform zurückschlägt. Eine Inkonstanz der Form *Kleinkolonie* wurde auch von E. Bautz und H. Marquardt (1954) beschrieben.

Diskussion:

Das Auftreten von **Kleinzellen** in den behandelten Kulturen könnte auf einer bloßen Giftwirkung beruhen, es wäre aber auch denkbar, daß die Zellteilung gegenüber der Zellstreckung relativ beschleunigt wird. Es ist aber noch zu beachten, daß auch von den normalen Zellknospen kleinzellige Stadien durchlaufen werden; deshalb ist ein Fehlen oder eine partielle genetische Konstanz dieser Zellform nur äußerst schwierig nachweisbar.

Riesenzellen, wie sie R. Bauch nach Behandlung mit BP an Bierhefe erzielte, wurden in den von mir durchgeführten Versuchen nicht gefunden. Die Behandlungszeit in seinen Versuchen war aber niemals länger als 36 Std. (in meinen Versuchen 25 Tage!). Es kann aber während einer solch kurzen Expositionszeit wohl kaum eine Zelle „cancerisiert“ werden; dagegen liegt das Optimum für eine mutative Änderung im Chromatinbestand (wie aus den weiter unten beschriebenen Versuchen mit *Vicia* hervorgeht) in den Anfangsstunden der Exposition.

Es ist also sehr unwahrscheinlich, daß jene *Gigas*-formen durch die „cancerogene“ Wirkung des BP hervorgebracht werden, zumal auch mit Accnaphten, Campher usw. — also nichtkrebserzeugenden, aber polyploidisierenden Agenzien — ebenfalls *Gigas*-formen erzeugt werden können. Verdanken aber die *Gigas*-stämme lediglich einer polyploidisierenden Wirkung ihre Existenz — und nicht einer cancerogenen —, so ist hierin kein Zusammenhang mehr mit einem Cancerisierungsprozeß zu erkennen.

Hierzu wäre noch ein Befund aus den Versuchen desselben Autors anzuführen, demzufolge die cancerogenen Azofarbstoffe keine *Gigas*-formen erzeugten (bei diesen Stoffen wurde auch keine Spindelstörung in den von mir mit *Vicia* durchgeführten Versuchen gefunden).

Bezüglich des Auftretens von **Kleinkolonieformen** reagierten die von mir verwendeten Weinhefestämme zumindest quantitativ gleich gut wie die Bäckerhefe von Ephrussi. Die nur geringfügige Erhöhung der Zahl der Kleinkolonien nach Cancerogenbehandlung kann also keinesfalls auf einer Reaktionsträgheit der Stämme beruhen.

Leider konnte noch nicht untersucht werden, ob das Cytochromsystem in anderer Weise abgeändert worden ist, wie bei Ephrussi's Kleinkolonieformen. Bei jenen erinnert der Defekt im Cytochromsystem, der — wahrscheinlich — ursächlich mit einer Veränderung des Atmungs-Gärungsverhältnisses und damit einem geringen Energiegewinn verbunden ist (was zu der auffallenden Erscheinung der „kleineren Kolonie“ führt), sehr an die alten Vorstellungen Warburgs. Wäre jedoch ein echter Zusammenhang zur tierischen Cancerogenese gegeben, so müßte Trypaflavin ein extrem wirksames Cancerogen sein. Davon ist aber bisher nichts bekanntgeworden.

Vicia Faba

Die Mutationstheorie der Krebsentstehung wurde vielfach so verstanden, daß die cancerogenen Noxen Mutationen am Kernmaterial hervorrufen, die ihrerseits die Ursache für die veränderte Reaktionsnorm der Krebszellen sein sollten. Während nach Boveris Versuchen an bestimmte abnorme, disharmonische Chromosomenkombinationen (Genommutation) zu denken war, deuteten zahlreiche neuere Befunde ebensowohl auf Strukturmutationen an Chromosomen (Chromosomenmutation). An Zellen vollentwickelter maligner Tumoren findet man beiderlei Abnormalitäten oft in großer Zahl; nach dem derzeitigen Stand der Induktionsfrage beim tierischen Krebs, werden sie aber eher als Folgen, denn als Ursachen der Cancerisierung aufgefaßt. Trotzdem ist auch heute noch die Ansicht verbreitet, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen mutagener und cancerogener Wirkung bestehe (W. J. Burdette 1951 a und b, 1953 und Ch. Auerbach 1940). In der Literatur finden sich jedoch ebensoviele negative wie positive Befunde, z. T. mit denselben Stoffen, sogar von demselben Arbeitskreis. So hat z. B. M. Demerec seine ersten positiven Angaben (1949 a) noch im selben Jahre (1949 b) widerrufen. Dieselbe Unklarheit herrscht bezüglich der cytologischen Wirkung von Arsenverbindungen (H. J. Müller 1929; M. C. Mann 1923; R. Schütze 1943; H. Knig und R. J. Ludford 1950).

Als Objekte dienten bei den meisten Untersuchern *Drosophila*, *Neurospora* und *Escherichia coli*. Bei *Drosophila* macht offenbar die geeignete Applikation der Stoffe Schwierigkeiten. Bei *Neurospora* und *Escherichia* ist eine cytologische Differenzierung der Effekte unmöglich. Wesentlich günstigere Verhältnisse für Behandlung und cytologische Analyse bietet *Vicia Faba*, die bisher anscheinend kaum benutzt wurde.

Material und Methodik:

Es wurden Samen von *Vicia Faba* 3 bis 8 Tage bei etwa 27° auf Filtrierkarton angekeimt. Nachdem die Hauptwurzel eine Länge von 5 bis 7 cm erreicht hatte, wurde sie dekapitiert und die Pflanze auf eine Nährlösung gesetzt, die einen Zusatz

von 1 g „Mairol“ pro Liter enthielt. Sobald die neu hervorbrechenden Seitenwurzeln eine Länge von etwa 1,5 cm erreicht hatten, waren die Pflanzen für die Durchführung von Versuchen geeignet. Die getesteten Stoffe waren AB, AAB, DAB, AT, BP, AS und Coffein. Die Pflanzen wurden einzeln in verdunkelten Glasbehältern mit einem Volumen von 100 bis 125 ml so aufgestellt, daß die gesamten Wurzeln, aber nur diese, in die Flüssigkeit eintauchten. Die Pflanzen wurden von v-förmig gebogenen Glasröhrchen gehalten, die so mit Draht untereinander verbunden waren, daß dieser selbst nicht in die Lösung eintauchen konnte (siehe nebenstehende Fig. 1). Ein Teil der untersuchten Stoffe ist nur sehr wenig in Wasser löslich, deshalb wurde in solchen Fällen ein Lösungsvermittler angewendet. Im folgenden wird eine Zusammenstellung der in den einzelnen Versuchen angewendeten Stoffe, ihrer Konzentrationen und der Konzentration des Lösungsvermittlers Tween 20 gegeben:

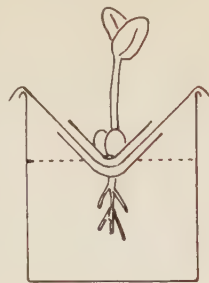


Fig. 1.

Tabelle 2.

Stoff	Konz. des Stoffes mM/l	Konz. des Lösungsvermittlers Tween 20 in Vol. %
BP	0,4	2
DAB	1	2
AT	1	1,5
AAB	1	1,5
	2	1,5
	4	2
AB	1	2
AS 60 (mg/l)	0,5	—
25 „	0,2	—
10 „	0,08	—
5 „	0,04	—
Coffein	1	—

Die Substanzen wurden — falls Tween 20 zugesetzt werden mußte — zuerst in diesem (AT jedoch nur in 50%igem) gelöst und dann mit Nährlösung verdünnt. Sämtliche Lösungen wurden mit Kalilauge bzw. Salzsäure auf ein pH von 6,5 eingestellt.

Von jedem der an *Vicia* geprüften Stoffe — außer Coffein — wurden jeweils zwei Versuchsreihen angesetzt. Sie werden im folgenden der Einfachheit halber als „K“- (Kurz) und „L“- (Lang) Serie bezeichnet. Für die **K-Serie** war eine Behandlungszeit von 24 Stunden vorgesehen mit anschließender Zurückversetzung in Nährlösung. Fixiert wurden Wurzeln in der K-Serie 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Behandlungsende. Für jeden Versuch wurden sechs Pflanzen verwendet, cytologisch untersucht wurden pro Stoff und Fixierung vier Wurzeln. Die **L-Serie** wurde einer bedeutend längeren Behandlung unterworfen. Es wurde eine geeignete Konzentration ausgewählt, bei der die Pflanzen möglichst lange wachsen konnten, aber dennoch nach Möglichkeit eine deutliche Wachstumstörung zeigten. Fixiert wurde in der L-Serie 24, 48, 96, 144, 192 usw. Stunden nach Behandlungsbeginn. Zeigte sich allmählich eine zunehmende toxische Wirkung der Stoffes, so wurde die weitere Be-

handlung eingestellt (jedoch nicht vor Ablauf von 14 Tagen nach Behandlungsbeginn), die Wurzeln in Wasser zurückversetzt und erneut beobachtet. Für sämtliche Versuche der K- und L-Serien wurden **Wachstumskurven** angefertigt und jeweils ein bis drei unbehandelte Pflanzen in den Versuch als Kontrolle miteinbezogen. Die Anfertigung der Präparate erfolgte nach einer Methode, welche die Herstellung von Dauerpräparaten erlaubt.

Ergebnisse:

A. Wachstum der Wurzeln

Die Substanzen BP, DAB, AT, AAB und AB wurden als Lösung mit Tween 20 als Lösungsvermittler geboten (Konzentrationen siehe Tab. 2). AS und Coffein wurden in wässriger Lösung verabreicht.

Tab. 3 für die **K-Serie** auf S. 50 gibt den Zuwachs der beiden längsten Wurzeln an jeder der sechs Versuchspflanzen innerhalb des Zeitraumes zwischen Versuchsbeginn und -ende, — also 144 Std. — wieder. Der statistische Vergleich der Einzelwerte für das Wurzelwachstum erfolgte nach dem *t*-Test³. *P* ist die Wahrscheinlichkeit der Nicht-Identität von Kontrolle und Versuch in Prozenten.

Tab. 5. *K-Serie*

Stoff	Konz. des St (mM/l)	Lös. verm. %	Zuwachs in cm			<i>P</i> %
			arith. Mittel	Max.	Min.	
BP	0,4	2	3,9	4,0	3,8	99
DAB	1	2	3,6	3,8	3,4	75
AT	1	1,5	6,0	6,6	3,9	96
AAB	1	1,5	4,1	4,7	3,7	99
	2	1,5	4,5	6,3	3,5	100
	4	2	5,6	7,4	3,3	96
AB	1	2	5,9	7,9	3,2	93
—	—	2	3,5	3,6	3,4	<i>t</i>
—	—	1	3,7	3,7	3,6	75
AS	0,5	—	3,8	3,9	3,7	100
	0,2	—	6,3	6,5	6,1	100
Coffein	1	—	2,4	2,4	2,3	100
Nähr.	—	—	5,5	5,7	5,3	<i>t</i>

Aus dieser Aufstellung ist zu ersehen, daß das krebserzeugende DAB keinerlei Wachstumsantrieb nach 24stündiger Behandlung ausübt. Eine gesicherte Stimulation des Wachstums der Wurzeln ergibt sich nach Behandlung mit BP. Bei AAB 4 mM/l macht sich bereits eine toxische Wirkung bemerkbar (Absinken von *P*), da an einigen Wurzeln bereits eine Wachstumshemmung eintritt.

Das nichtkrebserzeugende AB ist in seiner Wirkung auf das Wachstum

³ E. Weber: Grundriß der biologischen Statistik, G. Fischer, Jena 1956, Seite 187.

nicht von AT unterschieden ($P=10\%$), das gleiche gilt für AAB 4 mM/l und AT ($P=40\%$), sowie AAB 4 mM/l und AB ($P=20\%$). Dagegen sind die Kontrollen in Tween 20 und Nährlösung sicher unterschieden ($P=100\%$). In diesem Zusammenhang muß auf die P-Werte der obigen Tabelle hingewiesen werden, die Werte der Stoffe in Lösungsvermittler beziehen sich nämlich auf Tween 2%, diejenigen der Stoffe, welche in wässriger Lösung geboten wurden, auf Nährlösung.

Eindeutigere Ergebnisse liefert die **L-Serie**, die das Verhalten des Wachstums der Wurzeln bei chronischer Vergiftung zeigen sollen. In Fig. 2 ist der arithmetische Mittelwert der Wachstumskurven des Lösungsvermittlers als Bezugsgerade 0 eingetragen. Das schraffierte Feld stellt die Ab-

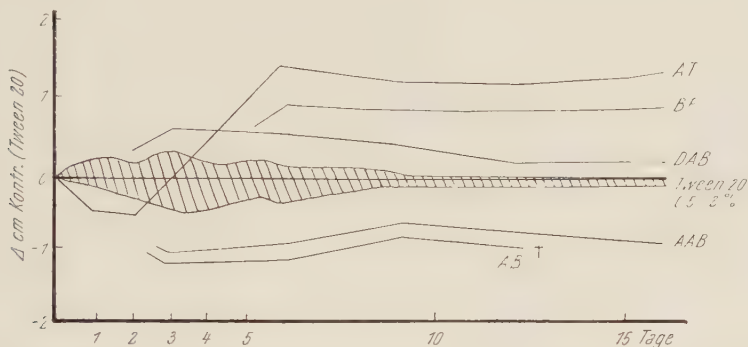


Fig. 2. Abweichungen des Wachstums der Wurzeln von *Vicia Faba* bei Behandlung mit verschiedenen Stoffen.

weichungen der Mittelwerte des Wurzelwachstums zwischen 0.5 und 2% Tween 20 dar. Die Werte sind jeweils an den beiden längsten Wurzeln von jeder der sechs Versuchspflanzen gewonnen. Alle Stoffe wurden in einer Konzentration von 1 mM/l — mit Ausnahme von AAB, das in der vierfachen Konzentration verabreicht wurde — geboten.

Für die Feststellung des Zuwachses wurde aus verschiedenen Gründen der 12. Versuchstag ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt sind die Wurzeln in AB bereits am Absterben. AAB — allerdings in der vierfachen Konzentration — unterbindet jegliches Wachstum. DAB ist nur sehr wenig von der Kontrolle unterschieden. Die Werte für BP und AT liegen oberhalb der Kontrolle (schraffierter Raum). Dies besagt aber nichts anderes, als daß zumindest diese drei Cancerogene nur eine geringe Schädlichkeit, am Wachstum gemessen, besitzen, im untersuchten Fall wirken sie sogar wachstumsfördernd. Die Wachstumskurven dieser drei Stoffe, DAB, BP und AT, würden ferner in ihren Anfangsteilen ein gemeinsames Verhalten zeigen, sie liegen nämlich in diesem Bereich unterhalb der Kontrollwerte, wie es für AT durchgezeichnet und für BP noch aus dem Verlauf des aufsteigenden Schenkels zu erkennen ist. Leider aber überdecken sich die Meßwerte der einzelnen Versuchsexemplare einer Stoffserie, so daß der Anfangsverlauf der Mittelwertskurve sich zeichnerisch nicht gut darstellen läßt — mit Ausnahme von AT.

Die Versuche der L-Serie mit AS liefern ein anderes Bild (Fig. 3). Die Zahlen der Kurven geben den Gehalt der Lösung mg/l $\text{As}(\text{OH})_3$ an. Der schraffierte Bereich ist von den Extremwerten der Wurzeln in Nährlösung umschlossen. Die Bezugsgerade 0 stellt den arithmetischen Mittelwert des Zuwachses in Nährlösung dar. In der Versuchsreihe mit 0,5 (Kurve 60) und 0,08 mM/l (Kurve 10) starben die Wurzeln innerhalb weniger Tage; das Wachstum war stark gehemmt. 0,04 mM/l (Kurve 5) bewirken eine kurzfristige Bremsung des Wachstums, der aber (noch während des Aufenthaltes in AS-Lösung!) eine Förderung folgt, so daß die Kurve wieder den Kontrollwert erreicht.

Das makroskopische **Aussehen der Wurzeln** war gegenüber der Kontrolle nicht verändert — eine Ausnahme bildet AT. In dieser Substanz zeigen die Wurzeln wenige Millimeter unterhalb der Zone, welche sich zu Versuchsbeginn in der Streckungsphase befand, eine deutliche Einschnürung, von der aus die Wurzel mit verjüngtem Querschnitt weiterwuchs. Tumoren wurden nicht gefunden, auch nicht die von der Colchicinwirkung her bekannten und als „C-Tumoren“ bezeichneten Anschwellungen der Streckungszone.

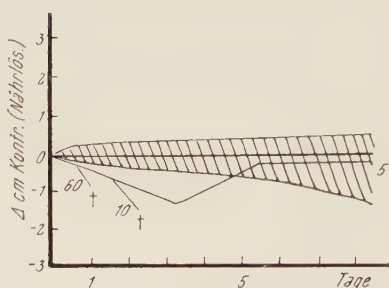


Fig. 3. Abweichung des Wachstums der Wurzeln von *Vicia Faba* bei Behandlung mit arseniger Säure in verschiedener Konzentration.

B. Kernteilung

Die Auswertung der karyologischen Befunde der K- und L-Serien ist in Tab. 4 und 5 zusammengestellt. In diesen beiden (und Tab. 6) sind die Angaben umgerechnet in absolute Zahlen, pro fünf Tage, pro Zentimeter Zuwachs und pro Wurzel. Die Werte wurden an vier Wurzeln gewonnen,

Tab. 4. K-Serie.

Stoff	Konz.	Tween	KK	CE	Fr	Tr	IK	Summe
BP	0,4 mM	2%	0,7	0,5	0,2	4,0	(+)	5,4
DAB	1	2	1,6	0,6	0,2	0,2	(+)	2,6
AT	1	1,5	1,7	0,8	1,0	0,6	++	4,1
AAB	1	1,5	1,2	0,3	0,7	0,3	—	2,5
	2	1,5	3,8	0,8	1,2	1,3	—	7,1
	4	2	4,6	1,2	2,0	2,4	—	10,2
AB	1	2	2,8	0,2	0,3	0,4	(+)	3,7
Tween		2	1,0	0,3	0,2	0,3	(+)	1,8
AS	0,2	—	1,5	0,2	1,2	1,0	—	3,9
	0,5	—	4,1	0,3	3,1	1,5	?	9,0
Coffein	1	—	13,2	2,8	4,1	1,2	—	21,2
Nährl.	—	—	—	—	—	0,08	—	0,1

die jeweils vier verschiedenen Pflanzen entstammten. Die unter KK (= Kleinkern) aufgeführten Abnormalitäten beziehen sich auf zweikernige Zellen, deren Kerne in ihren Größenverhältnissen deutlich voneinander oder — falls dies nicht zutrifft — gegenüber dem Normalwert verschieden waren. Es wurden jedoch nur solche Kleinkerne hierher gerechnet, die nach ihrem Aussehen und ihrer Größe aus mindestens einem ganzen Chromosom hervorgegangen sein konnten. Kleinere Kernreste von inhomogenem Aussehen und oft unregelmäßiger Form wurden als Fragmente (= Fr) bewertet. Als Chromatinemission (= CE) wird das Vorhandensein von feulgenpositiver Substanz außerhalb des Kernes in Form kleiner strukturloser Tropfen bezeichnet. Unter Inhaltskörpern (= IK) werden Gebilde in den Nukleolen verstanden, wie sie in Abb. 4 aus einem unfixierten Wurzelquerschnitt (AT in 1,5% Tween 20, 24 Stunden) wiedergegeben sind. Die Einschlüsse sind kristalloider Natur und farblos (nur mit AT hautfarben) und entstehen wahrscheinlich durch Gelierung des Nukleoleninhaltes. Sie sind sehr beständig und lassen sich oft noch in der nächstfolgenden Mitose im Cytoplasma nachweisen. In Tab. 4 bedeutet ++ das Vorkommen in allen Nukleolen. Die Zahlen in Tab. 5 geben die Tage nach Versuchsbeginn an, an denen ein Maximum gefunden wurde. An multipolaren Mitosen waren regelmäßig nur tripolare (= Tr) aufgetreten, vierpolige Teilungen fehlten

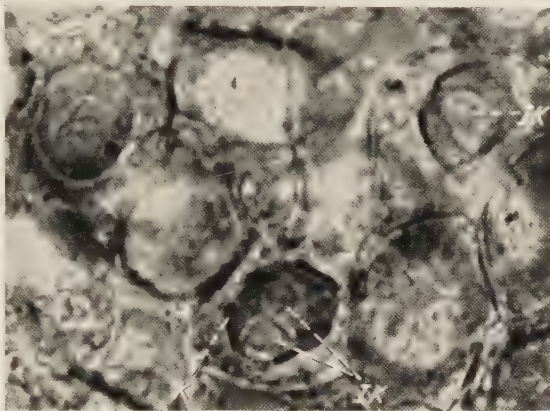


Abb. 4. (Lebendaufnahme) Inhaltskörper in den Nukleolen nach 24 Stunden Behandlung des Wurzelmeristems von *Vicia Faba* mit o-Aminoazotoluol in 1,5% Tween 20. IK = Inhaltskörper, K = Kern.

Tab. 5. L-Serie.

Stoff	Konz.	Tween	KK	CE	Fr	Tr	IK
BP	0,4 mM	2%	0,4	0,095	0,07	0,97	9
DAB	1	2	0,55	0,16	0,06	—	2 u. 8
AT	1	1,5	0,395	0,205	0,105	0,02	1 u. 2
AAB	4	2	1,755	0,32	0,356	0,05	—
AB	1	2	3,37	0,95	0,065	0,61	9
Tween		1	0,385	0,13	0,05	—	12
		2	0,385	0,093	0,055	—	3 u. 9
AS	0,04	—	0,041	—	0,107	—	—
Nährf.	—	—	—	—	—	—	—

bereits. In der K-Serie mit AS 0,5 mM/l wurden zwei Sternmetaphasen gefunden.

K-Serie:

Der zeitliche Verlauf des Auftretens von **Chromatinemission** war bei allen untersuchten Stoffen vollkommen unregelmäßig, ebenso der des Auftretens **tripolarer Mitosen** in AAB sowie Tween 20 und AS in allen Konzentrationen. Die Frequenz der mit BP erzeugten tripolaren Mitosen weist ein Maximum in den ersten drei Versuchstagen auf und sinkt dann rasch ab.

Die **Fragmentation** weist in AAB, ähnlich wie in AT und Coffein, einen konstanten Betrag während der ganzen fünf Beobachtungstage auf. AS jedoch zeigt ein Maximum 28 Std. nach Beginn der Behandlung. Die übrigen der untersuchten Stoffe zeigen keine wesentliche derartige Aktivität.

Die gleiche zeitliche Verteilung der **Kleinkerne** wie Coffein zeigt AT, mit einem Gipfel 24 Std. nach Versuchsbeginn, dann ein Absinken auf etwa drei Viertel des Wertes und einem erneuten Anstieg bei 72 Std. Ein zweiter Gipfel — bei AT ist er nicht deutlich erkennbar, bei Coffein übersteigt er den Wert des ersten — liegt bei 120 Std. Eine ähnliche Kurve gibt AAB in 2 und 4 mM/l, es treten auch bei diesem Stoff zwei Gipfel auf, diese liegen aber bei 48 und 96 Std. nach Versuchsbeginn. In AB, DAB und Tween 20 steigt die Zahl der Kleinkerne mit zunehmender Versuchszeit stetig an.

Da als „Kleinkern“ nur gezählt wurde, was aus mindestens einem ganzen Chromosom hervorgegangen sein dürfte, und die Kleinkerne somit aus tripolaren Mitosen, bzw. einzelnen, abseits liegengebliebenen Chromosomen entstanden sein müßten, wäre eine deutliche Parallelität in den Zahlen der Kolonnen KK und Tr zu erwarten. Eine solche ist aber nicht ersichtlich. Der Grund liegt wohl darin, daß ein Teil der Kleinkerne aus Mitosen stammt, die infolge von Chromosomen-Verklebungen („Stickiness“) abnorm verliefen. Tatsächlich erzeugt Tween 20, DAB, AB und die höheren Konzentrationen von AAB sehr deutlich solche Verklebungen. Gleiches dürfte übrigens auch für die Zahlen der Kolonnen Fr und CE zum Teil gelten.

L-Serie:

Bei Dauerbehandlung sind zeitliche Unterschiede in der Verteilung von Mitoseabnormalitäten nicht festzustellen. Bei allen Stoffen nimmt die Zahl der **Kleinkerne** pro Zentimeter Zuwachs mit fortschreitender Versuchsdauer zu, ebenso verhält sich die Zahl der **tripolaren Mitosen** (dies gilt aber nicht für BP und AS!). Der Betrag an **Fragmentierung** bleibt etwa konstant, steigt aber nach dem zehnten Behandlungstag, wohl als Folge zunehmender Stickiness leicht an.

Die karyologische Wirkung der einzelnen Stoffe:

Im folgenden wird versucht, eine vergleichende quantitative Analyse der mitotischen Abnormalitäten zu geben. Wegen der größeren Gleichmäßigkeit der Einzelwerte eignet sich die K-Serie am besten. Die in Tab. 4 unter

„Summe“ angeführten Werte sind infolge der durchgeführten „Normung“ miteinander vergleichbar, da sie die Zahl der beobachteten abnormalen Mitosen für fünf Tage auf 1 cm Zuwachs einer Wurzel angeben (dabei ist die Zahl des Lösungsvermittlers zu berücksichtigen!). Es läßt sich also auf diese Weise die Intensität der Wirkung der einzelnen Stoffe auf die Mitose einigermaßen erfassen. In der folgenden Tabelle 6 wird dies durchgeführt.

Tab. 6. *Karyologische Wirkung der untersuchten Stoffe.*

Stoff	Konz. (mM)	„Summe“ (Tab. 4)	Vorherrschende Wirkung
Coffein	1	21,2	Fragmente; tripolare Mitosen; Chromatinemission (Stickiness)
AS	0,5	9,0	Fragmente; tripolare Mitosen, bes. in niedrigeren Konzentrationen; Stickiness (Chromatinemission?)
BP	0,4	3,6	tripolare Mitosen (Chromatinemission)
AT	1,0	2,3	Inhaltskörper im Nukleolus; Fragmente (tripolare Mitosen; Stickiness)
AB	1,0	1,9	Stickiness; Teilungshemmung
Tween	2%	1,8	Stickiness; Teilungshemmung; Chromatinemission und tripolare Mitosen
DAB	1,0	0,8	Chromatinemission
AAB	1,0	0,7	Teilungshemmung Stickiness (Fragmente?)

Diskussion:

Unter den Ergebnissen dieser Versuchsgruppe sind also folgende für die Fragestellung besonders bemerkenswert:

1. Bei den geprüften cancerogenen Stoffen kann eine anfängliche Hemmung des Wachstums der Wurzel nach kurzer Zeit in eine Förderung umschlagen.

2. Auch im Langzeitversuch (mindestens 14 Tage Behandlung) wurden keine morphogenetischen oder histologischen Störungen der Wurzelentwicklung beobachtet.

3. Verglichen mit dem nichtcancerogenen Coffein ist die strukturmutterogene Wirkung der untersuchten Cancerogene auffallend gering; höchstens AS könnte eine ähnliche Aktivität entwickeln.

4. Der bei den cytologischen Effekten in einigen Reihen gefundene zweite Häufigkeitsgipfel deutet auf eine vorläufig noch unverständliche Spätwirkung.

5. Sowohl die allgemeine Giftigkeit, beurteilt nach der Wirkung auf das Wurzelwachstum, wie die mutagene Wirkung auf das Chromatin waren bei den Cancerogenen (wieder vielleicht mit Ausnahme von AS) geringer als bei den Vergleichsstoffen.

Moose

Unter den Laubmoosen gibt es zahlreiche Gattungen, die hinsichtlich künstlicher Kultur, Behandlungsmöglichkeit und mikroskopischer Beobachtung ihrer Zellen im Leben den Pilzen mindestens gleichkommen. Ihre wesentlich reichere Differenzierung und ihr hohes Regenerationsvermögen auf allen Entwicklungsstadien schienen besonders geeignet, den Einfluß der cancerogenen Stoffe auf die Differenzierung sowie Ent- bzw. Um-differenzierung nach künstlich ausgelöster Regeneration oder Explantation zu untersuchen. Außerdem lassen sich bei vielen Arten mendelistische Kreuzungsversuche durchführen, wobei nukleäre und extranukleäre genetische Änderungen festgestellt und voneinander unterschieden werden können.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das diözische Laubmoos *Bryum caespiticium* verwendet und zwar ausschließlich ein weiblicher Klon, um auch eventuelle genetische Änderungen im extranukleären Erbgut analysieren zu können.

Nährmedium und Anzucht:

Als Nährboden diente ein abgewandelter Bennecke-Agar der folgenden Zusammensetzung:

CaCl ₂ (anhydr.)	0,6% Gew.	10 ml
KNO ₃	1,0	10
MgSO ₄	0,3	10
K ₂ HPO ₄	0,7	10
FeCl ₃	1,0	1—3 Tropfen
Leitungswasser		960 ml
Agar		15 gr
pH=5,8 bis 6 (mit FeCl ₃ eingestellt).		

Auf diesem Nährboden wurde zunächst die Anzucht von pilz- und bakterienfreien Kulturen vorgenommen, die in den folgenden Versuchen eingesetzt wurden. Für die Behandlung in flüssigem Nährmedium wurde die obige Lösung verwendet, jedoch ohne Agar.

Versuch 1: Protonema auf Agar

Material und Methodik:

Der übliche Nährboden wurde etwa 1 cm hoch in Petrischalen gegeben. Untersucht wurden die Substanzen BP, DAB, AT, AB und AAB sowie AS. Die ersten vier Stoffe wurden in fester Form dem anquellenden Agar zugesetzt, und zwar soviel Substanz, daß sie in einer „übersättigten Lösung“ vorlagen. AS und AAB wurden dagegen bereits in gelöster Form dem Agar zugesetzt.

Die Anzahl der Platten pro Stoff war zwei, wozu noch jedesmal dieselbe Anzahl als Kontrolle hinzukam, die nur normalen Nährboden enthielten. Aufgeimpft wurden auf jede Platte sechs Stämmchen, alle aus derselben Reinkultur. Soweit nötig, wurden sämtliche vier Schalen unter eine 5 cm hohe Schicht einer 10⁻³-molaren Lösung desselben Stoffes als Fluoreszenzschutz gegeben, um eine photodynamische

Schädigung der Pflanzen durch die Fluoreszenz des aufgenommenen Stoffes zu verhindern. Damit die Belichtungsverhältnisse in der Kontrolle dieselben wie in der Serie mit Agens waren, wurden die zugehörigen Kontrollschalen — wie aus dem Obenstehenden bereits hervorgeht — ebenfalls unter die Flüssigkeitsschicht gestellt. Die Beobachtung des heranwachsenden Protonemas erfolgte laufend über acht Wochen. Die Versuche wurden bei zwölfstündiger, künstlicher Beleuchtung in einer Klimakammer bei 19—22° von März bis August 1958 durchgeführt.

Ergebnisse:

Als vollkommen wirkungslos erwiesen sich 0,1 mg/l BP und 0,5 mg/l AB; also diejenigen Stoffe, welche am schwersten in Wasser löslich sind. Auch Konzentrationen an AS von 1 mg/l und weniger erwiesen sich als zu gering, um irgendeinen sichtbaren Effekt auszuüben. Zu toxisch wirkte dagegen AS in der Konzentration von 100 mg/l, ebenso AAB in voller Sättigung (9,5 mg/l). Einen genau definierbaren Effekt lieferten AAB (2,0 mg/l), AS (10 mg/l), DAB (0,5 mg/l) und AT (2,0 mg/l). Im allgemeinen nahm die Wirkung in der Reihenfolge

DAB AT AAB und AS

zu (falls man die obigen Konzentrationen vergleicht).

An allen mit den obengenannten Stoffen behandelten Individuen zeigte sich makroskopisch ein Verblässen der grünen Farbe, das neugebildete Protonema war braun verfärbt, wie die Rhizoiden normaler Pflänzchen; ebenso erschienen die Flächen aller neugebildeten Blättchen (auch an den älteren Stämmchen) reduziert und blaß.

Das Ausmaß des regenerierten, bräunlich verfärbten **Protonemas** war in AT und DAB nur schwach, in AAB (2,0 mg/l) stark reduziert. In AS (10 mg/l) trat nur eine sehr schwache Hemmung des Protonemawachstums ein; trotzdem war es aber im Verlauf von sechs Wochen sogar zum Teil abgestorben.

Die **Bildung neuer Stämmchen** aus dem regenerierten Protonema war im allgemeinen stärker als das Wachstum des Protonemas gehemmt. In DAB und AT traten nur wenige auf, in AAB (2 mg/l) und AS (10 mg/l) überhaupt keine.

Aus diesem Versuch läßt sich eine mehr oder weniger starke Hemmung bei der Chlorophyllbildung und der Zellteilung im Protonema schließen sowie auf eine Erschwerung der Umdifferenzierung von Protonemazellen bei der Stämmchenbildung.

Es war nun von großem Interesse zu erfahren, ob die erhaltenen Effekte vererbbarer Natur sind. Deshalb wurde von jedem Stoff, sowie von der Kontrolle, je 40 der neugebildeten Stämmchen entnommen und in Röhrchen auf Normalagar gesetzt. Sämtliche dort neu entstandenen Teile, Protonema, Stämmchen, Seitentriebe aus allen Stämmchen usw. wiesen ein vollkommen normales Aussehen auf; auch mikroskopisch waren keine Abnormalitäten nachweisbar. Die erhaltenen Effekte waren also reversibel und nicht vererbbar.

Versuch 2: *Protonema submers.*

Material und Methodik:

Diese Versuchsreihe wurde in Reagenzgläsern ausgeführt, welche mit 7 ml Nährlösung + übersättigtem Agens beschickt waren. Untersucht wurden die Substanzen DAB und AT. Die Versuche wurden von März bis September 1959 in einem nordseitigen Gewächshaus bei 15–20° durchgeführt. Als Fluoreszenzschutz diente eine 10⁻³-molare Lösung von DAB bzw. AT in einer Glaswanne. Jedes Reagenzglas wurde mit drei Stämmchen aus derselben Reinkultur beimpft und zusammen mit der gleichen Anzahl nur beimpfter Nährlösung enthaltender Kontrollen in die entsprechende Lösung gestellt. Alle vier Wochen wurden Proben entnommen und untersucht. Die Behandlungszeit erstreckte sich über sechs Monate.

Ergebnisse:

In **AT** trat ein Zerfall der Chloroplasten bevorzugt im *Protonema* und eine Blockierung des Wachstums aller Teile ein (eine eingehendere Beschreibung siehe unter AT, Versuch 5).

In **DAB** ließ sich ein Ausbleichen der Chloroplasten sowie eine schwache Hemmung der Zellteilung im *Protonema* erkennen (es handelt sich um dieselben Effekte, wie sie in Versuch 3 unter AAB 1/4 beschrieben sind) und zwar nach einer Applikationszeit von vier Wochen; in späteren Proben zeigte sich keine erkennbare Wirkung von DAB, sondern die Individuen waren — neben wenigen Abgestorbenen — meist von normalem Aussehen.

Als Nebenfund ergab sich ein abnormales Verhalten bei der Bildung von Stämmchen aus dem *Protonema* in submerser Kultur; denn die Knospen wuchsen häufig — auch in der Kontrolle — zu einem *protonema*artigen Zellstrang aus.

Auch in dieser Versuchsreihe konnten keine vererbbaaren Effekte an Objekten nach dem unter Versuch 1 erwähnten Verfahren festgestellt werden.

Versuch 3: *Protonemabildung an abgeschnittenen Blättchen*

Material und Methodik:

In einer Petrischale von sechs Zentimeter Durchmesser wurden etwa 100 Stück abgetrennte Blättchen gegeben. Je untersuchte Substanz und Konzentration wurden drei mit Agenslösung beschickte und drei Kontrollschalen, die nur Nährlösung enthielten, verwendet; pro Stoff und Konzentration wurden also 600 abgetrennte Blättchen untersucht. Zur Vermeidung größerer Streuungen zwischen zusammengehörigen Schalen wurden von einem Stämmchen der Reinkultur nur zwei benachbarte Blättchen abgetrennt, wovon eines in die Kontrollschale und eines in die mit Agenslösung beschickte Schale verbracht wurde. Die sechs Schalen wurden unter eine konzentriertere Lösung desselben Stoffes als Fluoreszenzschutz gebracht (nicht aber die Schalen mit AS und die zugehörigen Kontrollschalen, da AS nicht fluoresziert). Die Versuche wurden bei zwölfstündiger, künstlicher Beleuchtung in einer Klimakammer während der Monate September 1958 bis Februar 1959 bei einer Temperatur von 19–22° ausgeführt. In bestimmten Abständen wurde die Zahl der Blättchen festgestellt, die *Protonema* regeneriert hatten. Alle abgestorbenen wurden als nicht existent betrachtet. Der Unterschied zwischen behandelten Blättchen und der jeweili-

gen Kontrolle wurde in Fig. 4 und 5 als Abweichung von einer Mittelwertskurve sämtlicher Kontrollwerte aufgetragen. Die Behandlungszeit erstreckte sich im allgemeinen über vier Wochen, in einzelnen Fällen bis zu sechs Wochen (AS unter 4 mg/l, DAB und BP).

Ergebnisse:

In **AS** wurde eine Konzentrationsreihe untersucht (in mg/l):

0,25; 0,5; 1,0; 4; 10; 20; 50; 100; 200.

Die Fig. 4 gibt die Abweichungen der einzelnen Versuche von der Kontrolle wieder. Die Zahlenangaben sind in mg/l gehalten. Die Mittelwertskurve sämtlicher Kontrollen ist als 0 bezeichnet. Zunächst ist ein scharfer Unterschied zwischen den Konzentrationen 20 und 50 zu beobachten. Während die Kurve 20 noch über die Kontrollkurve zu liegen kommt, ist dies bei

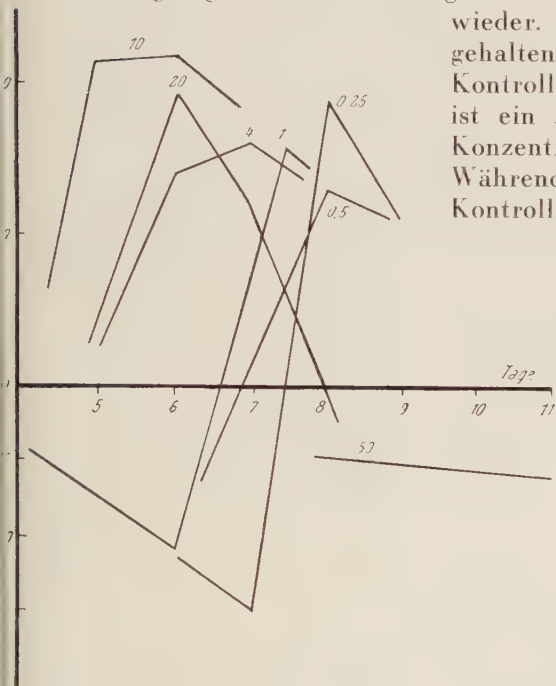


Fig. 4.

Fig. 4. Abweichungen in der Protonemaregeneration abgetrennter Blättchen von *Bryum caespitium* bei Behandlung mit arseniger Säure in verschiedener Konzentration.

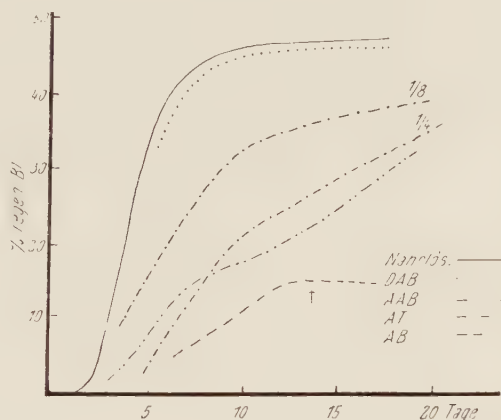


Fig. 5.

Fig. 5. Protonemaregeneration abgetrennter Blättchen von *Bryum caespitium* bei Behandlung mit Azofarbstoffen.

Kurve 50 nicht mehr der Fall. Betrachten wir den Durchtritt der übrigen Kurven durch die Gerade 0, so wird der Beginn der Förderung der Regeneration mit zunehmender Konzentration von 0,25 bis 10 auf einen immer früheren Zeitpunkt vorverlegt. Ab 20 mg tritt dann wieder eine Verzögerung ein; bei der Kurve 50 fehlt dieser Teil schließlich ganz. (Im Anfangsbereich der Kurven — vor dem fünften Versuchstag — ist der Prozentsatz der regenerierten Blättchen sehr niedrig, und die zufälligen Schwankungen können sich hier stärker auswirken.) Zu beachten ist ferner noch die Größe der Fläche, welche über der Kontrollkurve liegt: sie zeigt nämlich eindeutig

ein Maximum bei Kurve 10 und damit eine auffällige Übereinstimmung mit einer noch zu besprechenden Erscheinung. Ferner sei darauf hingewiesen, daß die Kurven 1,0 bis 0,25 in ihrem Anfangsteil alle unter der Kontrollkurve liegen, was wohl auch für die übrigen Kurven gelten dürfte, sich aber bei ihnen aus den obigen Gründen nicht mehr nachweisen läßt.

100 und 200 mg/l AS wirken innerhalb weniger Tage letal.

Das cytologische Bild der **Protonemazellen** weist eine weitgehende Veränderung bei der Behandlung mit AS auf. Die nachfolgend beschriebenen Erscheinungen sind mit 10 mg/l am zahlreichsten zu erhalten. Die Zeitangaben beziehen sich auf diese Konzentration. In den ersten 15 Tagen sind die **Chloroplasten** noch voll entwickelt und das Protonema weist kaum eine Wachstumshemmung auf. Schlagartig aber entfärben sich dann in den spitzennahen Teilen des Protonemas die Plastiden, werden kleiner und nehmen am 17. bis 19. Tag ein „proplastidenartiges“⁴ Aussehen an. Diesen Zustand gibt die Abb. 5 g für eine Protonemaspitzenzelle wieder. In dieser Zeichnung ist noch ein zweiter Vorgang dargestellt: es sind Plastiden von normaler Größe abgebildet, deren Lipoidanteil Entmischungserscheinungen aufweist und in Tröpfchenform der Plastidenmembran anhaftet. Dieser Vorgang wird bei AT noch ausführlich beschrieben. Ein zweites Stadium ist in Abb. 5 h dargestellt. Es sind nur noch Zellkern und Hyaloplasma vorhanden; die übrigen Zellorganelle sind degeneriert. Dieser Zustand wird bei einer Konzentration von 10 mg meist übersprungen, dagegen ist er sehr häufig in 4 mg nach etwa 26 Tagen Behandlungszeit zu finden. Das nächste Stadium beginnt mit einer lappigen Gestaltsänderung des **Kernes**. Der Endzustand ist in Abb. 6 wiedergegeben, er tritt in 10 mg etwa am 29. Tag und später auf. In dieser Phase ist der Kern ein rosenkranzartiges Gebilde und läßt

⁴ Sie weisen eine Ähnlichkeit mit den in den Rhizoiden vorhandenen Plastiden auf.

Abb. 5. Protonemaspitzenzellen von *Bryum caespiticium*. Veränderungen an den „Chloroplasten“ nach Behandlung mit verschiedenen Stoffen. a Kontrolle: Zwischen den Chloroplasten (punktiert) kleine, farblose, sphärische Körper (schwarz). — b Behandlung mit 1,82 mg/l o-Aminoazotoluol über 12 Tage. Beginn des Zerfalls der Chloroplasten, in den Plastiden Vakuolen und Lipoidtropfen (schwarz). — c Behandlung wie in b, 14 Tage, älteres Stadium des Zerfalls. Die Lipoidtropfen treten aus den Plastiden in das Cytoplasma über (kleine punktierte Körper); „membranlose“ Zerfallsform eines Plastiden ist durch einen Pfeil markiert (Plasmavakuolen weiß). — d, e und f stellen gleichbehandelte Zellen (wie a mit c) photographisch dar. — g Behandlung mit 10 mg/l arseniger Säure über 19 Tage. Ausgeprägter Plastidenzerfall im spitzenfernen Teil der Zelle. — h Mit 4 mg/l arseniger Säure über 26 Tage behandelt. Mitochondrien und Plastiden degeneriert. Die Zelle besteht nur noch aus einem Zellkern und einem (lichtmikroskopisch) körnchenfreien Cytoplasma. — i Behandlung mit 1,76 mg/l p-Aminoazobenzol über 28 Tage. Plastiden farblos und verkleinert; kein Zerfall. — k Mit 0,26 mg/l Azobenzol über 13 Tage behandelt. Plastiden grün, z. T. verkleinert. Keine Vakuolisierung und kein Zerfall in den Chloroplasten.

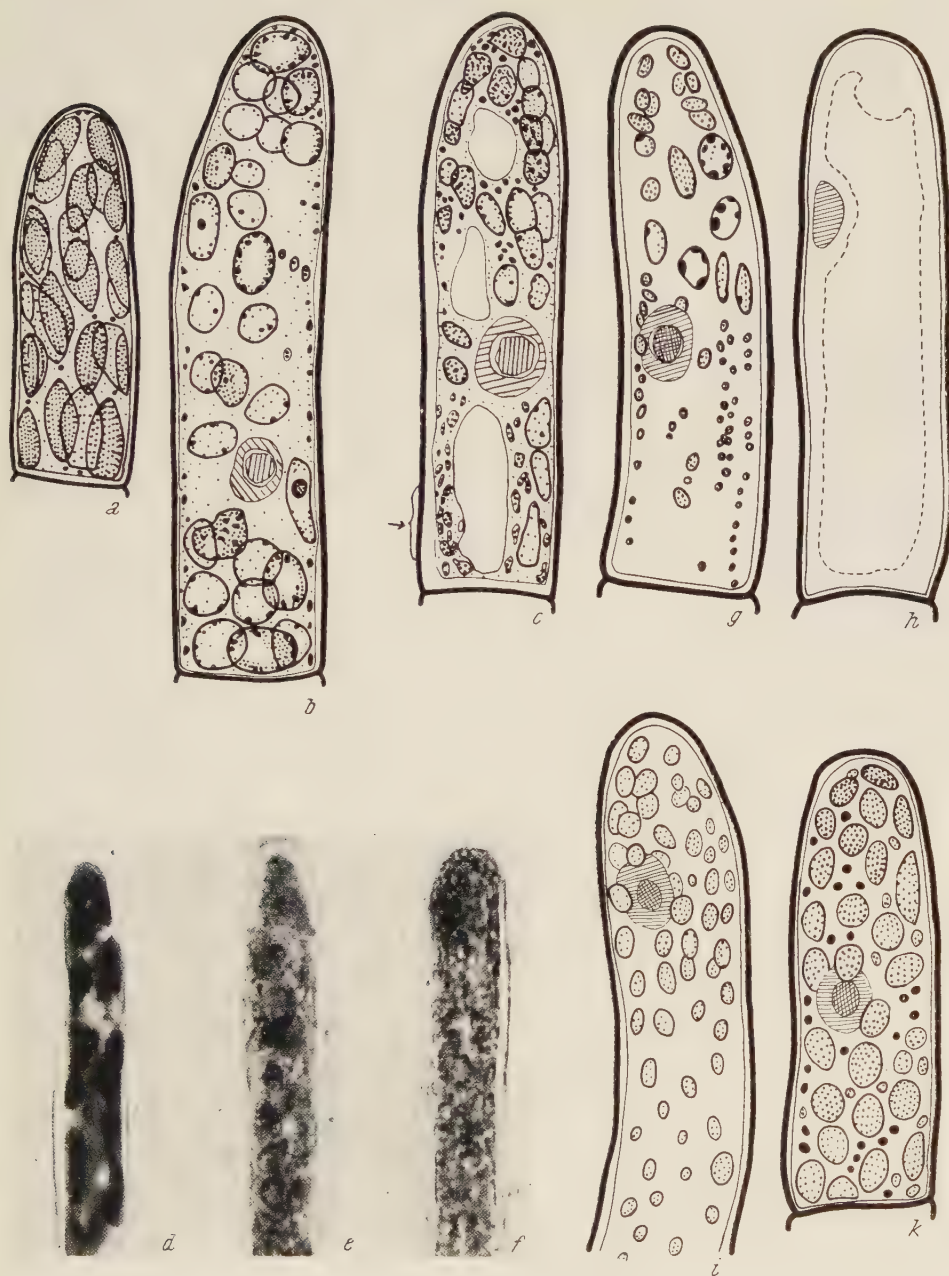


Abb. 5.

sich noch nach der Feulgen'schen Nuklealreaktion anfärben. Die Zelle ist noch turgeszent. Behandelt man noch einige Tage weiter, so sterben die Zellen am 34. Versuchstag ab unter Auftreten von Brown'scher Molekularbewegung im Hyaloplasma.

In niedrigeren Konzentrationen als 4 mg treten die obigen Erscheinungen in gleicher Reihenfolge auf, sind aber viel weiter auseinandergezogen und überlagern sich in den einzelnen Schalen daher sehr stark; außerdem sind diese Entartungserscheinungen zahlenmäßig bedeutend vermindert.

In höheren Konzentrationen, z. B. 20 mg, sterben die Zellen etwa vier Tage nach dem Ausbleichen des Chlorophylls um den 16. Tag ab, in 50 mg schon nach 13 Tagen. Die Plastiden im Protonema waren bei dieser Konzentration nach fünf Tagen vollkommen ausgebleicht. Die

beiden nächsthöheren Konzentrationen 100 und 200 mg, wirkten zu toxisch, als daß noch irgendwelche cytomorphologische Effekte beobachtet werden konnten.

Die Wirkung der übrigen geprüften Stoffe auf das Regenerationsverhalten von Moosblättchen erläutert Fig. 5. Die ausgezogene Kurve stellt das arithmetische Mittel sämtlicher Kontrollwerte (in Nährlösung) dar. Die übrigen Kurven leiten sich in der auf S. 59 angegebenen Weise davon ab. Es sei an dieser Stelle betont, daß nur Nährlösung mit Agenszusatz — also ohne Lösungsvermittler — verwendet wurde.



Abb. 6. Rosenkranz-artiger Zerfall des Kernes einer Protonemazelle von *Bryum caespitium* in arseniger Säure (10 mg/l, 29 Tage).

BP erzeugte in einer Konzentration von 0,005 mg/l nur eine so geringe Abweichung von der Kontrollkurve, daß in der gewählten Darstellungsform beide Kurven zeichnerisch in eine zusammenfallen würden; sie wurde deshalb in Fig. 5 weggelassen. Am regenerierten Protonema zeigte diese Substanz keinen sichtbaren Effekt.

DAB. Die Regenerationskurve für 0,46 mg/l verläuft ebenfalls sehr nahe an der Kontrollkurve. Entsprechend dem geringen Effekt auf die Regenerationsfähigkeit wurde bei diesem Stoff in der cytomorphologischen Untersuchung der Protonemen keinerlei Abweichung von der Kontrolle innerhalb dreißig Tagen gefunden.

Hier ist aber der Befund aus Versuch 2 anzuführen, demzufolge eine Degeneration der Chloroplasten in DAB eingetreten ist.

AB. Betrachtet man den Verlauf der rechtsseitigen Kurvenendteile, so fällt sofort zweierlei auf: Trotz der niedrigen Konzentration von 0,24 mg/l ist die Regenerationsfähigkeit stark gehemmt, ebenso das Wachstum des Protonemas. Diese Kurve könnte ohnehin niemals den Wert der Kontrolle erreichen, denn die regenerierenden Blättchenteile sterben mitsamt dem Protonema rasch ab. Infolgedessen sinkt die Kurve leicht.

Das in AB regenerierte Protonema war von normaler Farbe, wies aber eine starke Wachstumshemmung auf und starb unter zunehmender Braunfärbung im Verlauf von einer Woche ab. Die Plastiden sind nach dem Tode

noch erhalten, ja sie zeigen sogar noch etwas Grün. Eine stark geschädigte Zelle ist in Abb. 5 *k* wiedergegeben. Die Plastiden sind abgekugelt und zum Teil verkleinert, die Plasmagrana treten deutlich hervor. Die optische Dichte im Hyaloplasma ist vermindert. Schließlich stirbt die Zelle unter Auftreten von Brown'scher Molekularbewegung. Diese Symptome entsprechen dem allgemeinen Bild einer Vergiftung.

AT und AAB. Die **Regenerationskurven** für diese Stoffe lassen eine grundlegende Übereinstimmung erkennen. Beide Kurven weisen eine doppelte Krümmung auf, ihr rechter Teil steigt noch an; es ist also zu erwarten, daß bei Behandlung mit diesen Stoffen der Endwert der Kontrollkurve noch erreicht werden könnte. Die Zahlenangaben bei AAB in Fig. 5 geben die Sättigung der Lösung an. Eine vollgesättigte Lösung von AAB (7,06 mg/l) wirkt stark toxisch, so daß jegliche Regenerationstätigkeit unterbunden wird. Von AT beträgt die Lösungsgrenze 1,82 mg/l.

AAB. $\frac{1}{4}$ -gesättigte Lösung bewirkt nach 16 Tagen ein Ausbleichen der Plastiden. Diese Zellorganelle erscheinen also in den jüngeren Protonemazellen vollkommen farblos. An den Mitochondrien (färbbar mit 0,08% Janusgrün B, und (farblosen) Plastiden ließ sich keine Behinderung der Teilungstätigkeit erkennen; die Anzahl der Mitochondrien und Plastiden entsprach vollkommen dem Normalwert. Die Zellgröße im Protonema war unverändert, dagegen war die Zahl der Zellen vermindert, was auf eine Beeinflussung der Kernteilung schließen läßt. Die Abb. 5 *i* soll die geschilderten Effekte verdeutlichen. Sie stellt bereits das Extrem des durch Behandlung mit dem schwach cancerogenen AAB Erreichbaren in dieser Versuchsreihe dar.

AT erzeugt denselben Effekt zu Beginn des Versuches, jedoch ist die Wirkung dieses Stoffes auf die Plastiden viel ausgeprägter. Die Abb. 5 *b* und *c* zeigen den Verlauf der Degenerationerscheinungen. In den ersten sechs Tagen sind die Plastiden von vollkommen normalem Aussehen, wie es die Abb. 5 *a* für die Kontrolle zeigt. Dann nehmen diese Organelle Kugelform an und die Grana beginnen zu zerfließen (Abb. 5 *b*). In der Mitte dieser geschädigten Plastiden bildet sich am 12. Tage nach Versuchsbeginn eine Vakuole, oft mit einem globulären Inhaltskörper amorpher Natur, wie er in Abb. 5 *b*, rechts unterhalb der Mitte zu erkennen ist. Gleichzeitig beginnt sich der Inhalt des Plastiden zu entmischen, was sich darin zeigt, daß die Lipoidsubstanz in einzelne Tropfen zusammenfließt, die an der Membran haften. Wahrscheinlich werden von hier ab zwei verschiedene Wege beschritten, einerseits ist ein Durchtritt dieser Lipoidsubstanz durch die Membran zu vermuten, denn es wurden „Plastiden“ gefunden mit optisch vollständig erhaltener Membran, aber gänzlich inhaltsleer; andererseits wurde ein Zerfall beobachtet, wie er in Abb. 5 *c* (Pfeil) zu erkennen ist: Hier liegen die Lipoidtropfen noch in einer erkennbaren Anordnung, aus der sich ein Verlauf der Plastidenmembran rekonstruieren ließe, die Membran selbst ist aber optisch verschwunden. In beiden Fällen treten jedoch als nächstes Stadium im Hyaloplasma zahlreiche Tröpfchen auf, so daß die Protonemazellen in diesem Zustand entfernt an Pilzzellen erinnern, wie aus der Abb. 5 *f* hervorgeht. Diese Lipoidtropfen ließen sich mit Rho-

damin B anfärben, nicht aber mit Janusgrün (das infolge der stark erhöhten Permeabilität nur in einer Konzentration von etwa 0,002% angewendet werden konnte).

Die in den Abb. 5d bis f dargestellten Spitzenzellen sind mit 5% Formol fixiert. Für die photographischen Aufnahmen wurden die Plastiden mit Rhodamin B angefärbt; sie erscheinen daher dunkel.

Versuch 4: Weiterzüchtung der geschädigten Zellen

Das Plastidom der Spitzenzelle wird an der Stelle seiner intensivsten Teilung, nämlich im vordersten Teil, am wenigsten geschädigt. Ferner findet man im Protonema alle Übergänge vom ältesten, normalgestalteten Basalteil, bis zum jüngsten, immer stärker abweichend ausgebildeten Teil an der Spitze (sowohl bei AS, als auch bei AT). In AT und AS werden bevorzugt die vollausgebildeten Plastiden angegriffen, die Mitochondrien bleiben erhalten.

Es wurde nun der Versuch unternommen, die chloroplastenfreien Protonemazellen weiterzuzüchten, um eine eventuell vorhandene genetische Wirkung zu fassen. Daher wurden die regenerierten Protonemafäden samt den Blättchen, sobald sich die Plastiden auf einem Zerfallstadium, wie in Abb. 5c dargestellt, befanden, aus der (in Versuch 3 erwähnten) AT-Lösung entnommen und in Kontrollösung gegeben. Diese wurde in den ersten zwei Wochen jeden 2. Tag erneuert. Nach weiteren zwei Wochen waren die Zellen — mit Ausnahme der Spitzenzelle — in Längsrichtung gestreckt, besonders die Zellen 2 und 3, vom Spitzenende her gezählt. Nach der Streckung erreichten diese Zellen nicht ganz die doppelte (etwa 1,7fache) Länge; diese Zellen teilen sich nicht mehr. Der Kern (aus AT!) bleibt völlig normal gestaltet. Im Verlauf dreier weiterer Wochen wird das Cytoplasma vollkommen körnchenfrei, d. h. die Plastiden und Mitochondrien sind optisch nicht mehr nachweisbar. Diese Zellen zeigen dasselbe Aussehen (der Spitzenzelle), wie es in Abb. 5h — allerdings durch eine andere Behandlungsweise zustande gekommen — dargestellt ist und sterben dann innerhalb weniger Tage ab. Die Zellen 6 und 7 waren sechs Wochen nach Behandlungsende noch chlorotisch, ihr weiteres Schicksal wurde nicht verfolgt.

Gibt man dagegen Zellen, wie sie nach Behandlung von AAB auftreten — also mit nur entfärbten Plastiden —, in Kontrollösung und wäscht hierin 2 Wochen (jeden 2. Tag wechseln!), so tritt innerhalb dieser Zeit eine Grünfärbung der Plastiden ein und die (behandelten!) Spitzenzellen wachsen zu einem normal aussehenden Protonema aus.

Die Verteilung der zugegebenen Stoffe in der Zelle nach vierwöchiger Behandlungszeit wurde fluoreszenzmikroskopisch geprüft. Die intrazelluläre Verteilung entspricht genau den Befunden an Oospora, jedoch zeigen die Plastiden bei allen auf Fluoreszenz untersuchten Stoffen nur ein schwaches Aufleuchten, das sich in der Farbe von Chlorophyll unterscheidet, wobei es aber nicht ausgeschlossen ist, daß diese Erscheinung auf eine andere, als die jeweils gebotene Substanz zurückzuführen ist. Bemerkenswerterweise zeigte die Kontrolle nur die Fluoreszenz von Chlorophyll.

Diskussion:

Lassen sich aus den vielerlei beschriebenen Einzelheiten gemeinsame Effekte aller geprüften, carcinogenen Substanzen herausfinden?

Daß BP insofern aus der Reihe fällt, als es auf das Regenerationsvermögen keine nachweisbare Wirkung hat, dürfte ausschließlich mit seiner zu geringen Wasserlöslichkeit und damit ungenügenden Konzentration zusammenhängen. Die übrigen Stoffe weisen in mehrfacher Hinsicht gleichartige Wirkung auf, so in der schwächlichen Ausbildung der neu hinzuwachsenden Gametophytenteile, im Ausbleichen, der Verkleinerung und Degeneration der Chloroplasten. Doch finden sich auch bemerkenswerte Unterschiede, indem z. B. AAB trotz genügender Löslichkeit nur eine schwache Wirkung auf die Plastiden hat.

Das nichtcancerogene AB unterscheidet sich von den übrigen Stoffen auch hier wieder durch seine starke Giftigkeit, die manche Effekte nicht mehr zur Ausbildung kommen läßt.

Bei AS wurde eine Förderung der Regeneration noch über den Wert der Kontrolle hinaus festgestellt, während eine solche bei keiner der aromatischen Verbindungen vorkommt. Wenn sich AS auch hier, wie in vielen anderen Versuchen, etwas anders verhält als die übrigen Cancerogene, so vielleicht deswegen, weil es an einem anderen Punkt des Zellgeschehens angreift. $\text{As}(\text{OH})_3$ ist schwach sauer und hydrophil, die aromatischen Amine schwach basisch und lipophil. Außerdem deutet der zeitliche Verlauf der Regenerationskurve an, daß die Zellen sich an das Vorhandensein der Cancerogene (bis zu einem gewissen Grad) adaptieren können.

Angiospermen

Die Versuche mit den Vertretern der höheren Pflanzen lassen sich methodisch in zwei Gruppen einteilen:

Gruppe A: Es wird eine hohe Konzentration an Substanz örtlich begrenzt gegeben. Die Pflanzen wachsen normal in Erde. An dem 2 cm über dem Knoten dekapitierten Stengel wird eine Lanolinpaste mit dem Agens aufgetragen.

Gruppe B: Es wird eine niedrige Konzentration auf die gesamte Pflanze verteilt geboten; die abgeschnittenen Zweige werden in einer agenshaltigen Nährlösung kultiviert.

Gruppe A

Als Versuchspflanzen wurden Tomate (*Solanum lycopersicum* Sorte *Lukullus*) und *Bryophyllum daigremontanum* ausgewählt, außer wegen ihrer vermuteten Eignung deshalb, weil mit diesen Pflanzen von anderen Autoren Versuche durchgeführt worden waren, bzw. die Fähigkeit zur Bildung von Tumoren bekannt war.

Versuch 1: Nachprüfung der Angaben von M. Levine (1939)

Die Versuche des Autors wurden an der von ihm benützten Pflanze *Bryophyllum daigremontanum* mit seiner Methodik wiederholt. Eine 1%ige Äthersuspension von AT wurde auf die Stengelstümpfe von dreißig frisch dekapitierten Individuen

aufgetragen und die Stümpfe anschließend mit einer sterilen Stahlnadel durch einen Stich verletzt. Dasselbe Verfahren wurde an der gleichen Zahl von Kontrollpflanzen durchgeführt, nur wurde AT weggelassen. Zur Vermeidung des Eintrocknens der Schnittfläche wurden die Stümpfe nach 24 Stunden mit einem lose schließenden Fixierröhrchen überstülpt. Die Versuche wurden von Mai bis September 1959 in einem Gewächshaus durchgeführt.

An keinem Exemplar dieser Versuchsreihe zeigten sich die angegebenen Veränderungen (s. S. 35), weder zu dem von M. Levine erwähnten Zeitpunkt von 14 Tagen, noch zu einem späteren, obwohl die Pflanzen während der gesamten Versuchsdauer von 4½ Monaten nahezu täglich beobachtet wurden.

Die histologische Untersuchung ergab, daß durch die schädigende Wirkung des Äthers die obersten zehn Zellschichten an der Schnittfläche abgestorben waren (was während des Versuches die Graufärbung der Schnittfläche veranlaßt hatte). Darunter hatte sich Korkgewebe gebildet; dasselbe war entlang des Einstichkanals geschehen. Ein merklicher Unterschied zwischen Kontrollpflanzen und behandelten war nicht aufzufinden.

Versuch 2: Lanolinpaste mit Agens

Material und Methodik:

Die Stoffe AAB, AT, DAB und BP wurden bis zur Sättigung in Lanolin gelöst und dieses in einem gleichen Volumen Wasser emulgiert. Die so erhaltene Paste wurde auf die frischen Schnittflächen — von 20 dekapitierten Individuen je verwendeter Substanz — aufgetragen; die seitliche Epidermis des Stumpfes wurde in gleicher Weise bestrichen. Die Zahl der gleichbehandelten Kontrollpflanzen — sie erhielten nur Paste ohne Agens — war dreißig. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde ein allseitig lose sitzendes Fixierröhrchen über den Stumpf gestülpt und die Paste alle vier Wochen erneuert. Die Beobachtungszeit war von Juni bis Oktober 1959 bemessen. Als Testobjekte dienten Tomate und *Bryophyllum*.

Ergebnisse:

Tomate. Unter der Paste **seitlich an den Stümpfen** entwickelten sich an den mit DAB, vor allem aber an den mit AT behandelten Pflanzen nach etwa 4 Wochen blaßfarbige kleine Warzen, aus denen schließlich nach weiteren zwei Wochen kleine Wurzeln hervorbrachten. Die Frequenz dieser Effekte war 65% der behandelten Pflanzen.

Die histologische Untersuchung der Warzen ergab einzelne Gruppen in radialer Richtung gestreckter Zellen der 1. oder 2. Subepidermalschicht. Zellteilungen waren zu diesem Zeitpunkt (4. Monat) in den Warzen nur sehr spärlich vertreten. Die Plastiden waren nur unvollkommen ausgebildet, d. h., sehr klein und nahezu farblos.

Das **Kalluswachstum** der Schnittfläche war in der Behandlungsreihe AAB, DAB und AT in zunehmendem Maße gefördert. In DAB und vor allem in AT treten nach etwa fünf Wochen Behandlungszeit und etwas später einzelne rasch wachsende kugelförmige Gebilde auf der Kallusoberfläche hervor; diese Gebilde zeigen aber schon nach wenigen Tagen kein

weiteres Wachstum mehr. Da ihr weiteres Schicksal verfolgt werden sollte, wurden sie nicht histologisch untersucht.

In der **Kontrollserie** fehlten die Warzen an den Stümpfen, natürlich auch die Wurzelbildung. Der Kallus der Schnittfläche zeigte ein sattes Grün (demgegenüber war der Kallus auf der Schnittfläche der mit den cancerogenen Azofarbstoffen behandelten Pflanzen mehr von „glasiger“ Erscheinung).

Auch nach einer Versuchsdauer von zwei Monaten war das Wachstum der Kalli in den Kontrollen — im Gegensatz zu den behandelten Serien — noch nicht eingestellt.

Bryophyllum. Hier ist das Ergebnis ähnlich dem vorigen. Einen sicheren Effekt zeigte nur AT an den Stümpfen (die im Gegensatz zu obigem Versuch an Tomaten nur auf der Schnittfläche mit Paste bestrichen waren). Es traten an 4 Exemplaren (20% der mit AT behandelten Pflanzen) 6 bis 8 Wochen nach Behandlungsbeginn kurze Adventivwurzeln an den Kanten der Schnittfläche auf (Abb. 17 und 18). Diese Erscheinung wurde an den Kontrollpflanzen während der gesamten viermonatigen Beobachtungszeit nicht gefunden.

Unterschiede zwischen den behandelten Serien und der Kontrollreihe im Wachstum der Kalli der Schnittfläche konnten nicht festgestellt werden, da *Bryophyllum* nur eine sehr geringe Kallusbildung (im Vergleich zur Tomate) aufweist.

Sämtliche Achselsprosse waren normal ausgebildet.

Versuch 3: Lanolinpaste mit Agens + IES

Material und Methodik:

Da wiederholt berichtet wird, daß die Ausbeute an Crown gall-Tumoren zahlenmäßig und an Größe bedeutend erhöht wird, wenn man während der Inkubationszeit Auxin verabreicht, wurde auch ein Versuch mit einem Zusatz von IES ausgeführt. Verwendet wurde dieselbe Paste wie in Versuch 2, jedoch mit einem Zusatz — sowohl in der Kontrollpaste, wie in der agenshaltigen — von 0.01% IES. Die geprüften Stoffe, die Art und Anzahl der Versuchspflanzen und die Versuchszeit waren dieselben wie in Versuch 2. Den erneuerten Pasten wurde IES in der nämlichen Konzentration zugesetzt. Als nicht-cancerogener Vergleichsstoff wurde AB neben einer Kontrollserie verwendet.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse waren, wenn auch quantitativ verschoben, dieselben wie in Versuch 2. Nur traten diesmal bei den **Tomaten** die Adventivwurzeln auch an der Schnittfläche selbst auf, sowohl an den (mit IES behandelten!) Kontrollpflanzen wie — bedeutend mehr — an den (mit IES + Agens) behandelten Individuen, vor allem in der Serie mit AT. An **Bryophyllum** waren keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Stoffserien zu erkennen. **AB** hemmt an Tomaten und *Bryophyllum* jegliches Kalluswachstum, die Stümpfe sterben innerhalb von sechs Wochen bis zum nächsten Knoten ab.

Vergleicht man die Gewebswucherungen auf der Schnittfläche der nicht mit Agens behandelten Kontrollpflanzen von Tomate aus den beiden Ver-

suchen 2 und 3, so fällt sofort die „glasige“ Beschaffenheit der Kalli auf, welche nur mit IES behandelt waren. Diese Kalli erinnern vor allem an jene der mit AT behandelten Pflanzen in Versuch 2.

Die BP-haltige Paste bewirkte gegenüber den Kontrollserien sowohl in Versuch 2 als auch in Versuch 3 keinerlei Effekte. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung verlief vollkommen negativ. Wahrscheinlich war der Stoff nicht in die Zellen übergegangen.

Versuch 4: Adsorbiertes Agens

Material und Methodik:

Eine letzte Versuchsreihe wurde nur mit Tomaten in der Zeit von Juni 1958 bis Januar 1959 durchgeführt. Etwa 4 cm lange, in konzentrierter Salpetersäure gründlich gereinigte und danach ausgewaschene Magnesiastäbchen wurden wiederholt in agenshaltige Ätherlösung eingetaucht und bei 60° getrocknet. Geprüft wurden die Substanzen AT, DAB, AAB, AB sowie AS. Um AS zu adsorbieren wurden die Stäbchen in eine wässrige Lösung dieses Stoffes eingetaucht, die 50 mg/l enthielt und im Luftstrom getrocknet. Nach der letzten Trocknung wurden die Stäbchen etwa 3 cm tief in den Stumpf einer frisch dekapitierten Tomatenpflanze gedrückt. Um die Schnittfläche feucht zu halten, wurde auf den Stumpf ein Fixierröhrchen, allseitig lose anliegend, gestülpt. Je geprüfter Stoff wurden 20 Individuen verwendet sowie 50 Kontrollexemplare, deren Stäbchen vorher nur mit Ätherlösung durchtränkt worden waren.

Ergebnisse:

Die Kontrollpflanzen bildeten zunächst auf den Schnittflächen und um die Stäbchen einen Kallus. Nach kurzer Zeit trieben die obersten Achsel sprosse aus.

An den mit AS behandelten Pflanzen ließ sich keine charakteristische Feststellung machen, da im Verlauf von vier Tagen das Gewebe um die Stäbchen abstarb, so daß wahrscheinlich keine weitere Aufnahme der Substanz erfolgen konnte; denn zu keinem späteren Zeitpunkt mehr trat während des Versuches eine Veränderung am obersten Knoten oder dem Stumpf darüber auf. Das gleiche gilt für AAB und AB.

An den mit DAB, vor allen aber den mit AT behandelten Pflanzen, wurden zweierlei **Abnormalitäten** beobachtet. Die erste besteht in einer Störung des Austreibens der obersten Achselknospe. Es erscheinen nämlich mehrere Triebe an Stelle des einen Achselsprosses; das gelegentliche Auswachsen nur eines einzelnen Blattes dürfte auf ein Absterben des Restes des Achselsprosses zurückzuführen sein. Eine zweite Art der Störung fand sich an den normal aus der obersten Achsel wachsenden Sprossen. Ihre Blattspreiten

Abb. 7 bis 12. *Solanum lycopersicum*. Dargestellt ist die untere Zellhälfte: Plastiden (weiß) und Mitochondrien (schwarz). 7 a und b Zellen aus dem Rindenparenchym einer Kontrollpflanze. — 8 Zelle aus einem mit IES erzeugten Kallus. — 9 Zelle aus einem mit o-Aminoazotoluol erzeugten Kallus. — 10 Zelle aus dem Rindenparenchym mit p-Aminoazobenzol behandelt. — 11 Zelle aus dem Rindenparenchym mit p-Dimethylaminoazobenzol behandelt. — 12 Zelle aus dem „Kallus“ mit Azobenzol vorbehandelt und nachfolgender Applikation von IES.

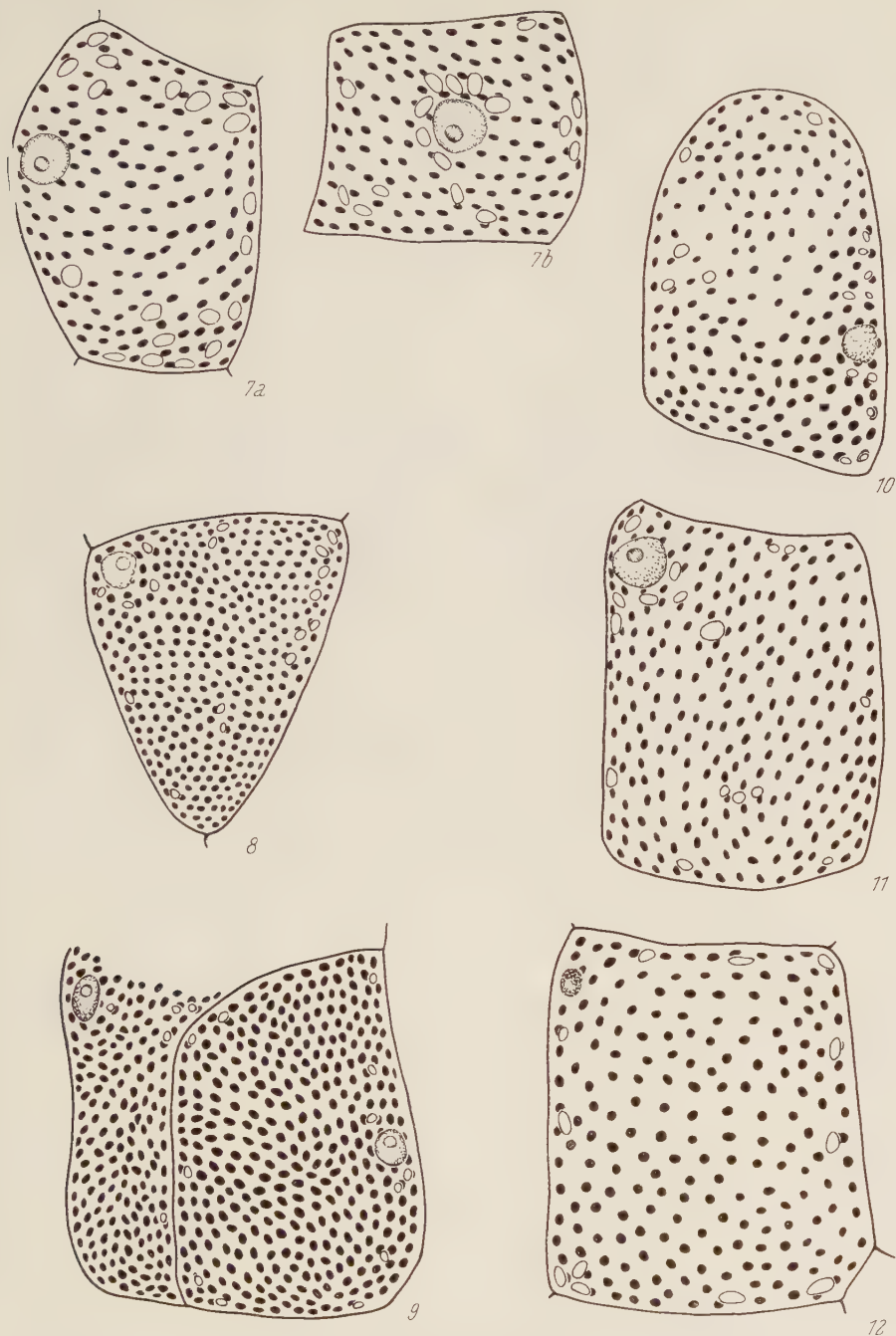


Abb. 7 bis 12.

waren gekräuselt und stark reduziert. Schließlich trat nach Ausbildung von zwei bis drei Blättern unter Anthozyanbildung ein allgemeiner Wachstumsstillstand ein und einige Wochen später starben die Sprosse ab. Alle Achselsprosse aus tiefer gelegenen Knospen waren normal.

Die vorstehend beschriebenen Einzeleffekte waren nur an weniger als 30% der behandelten Versuchspflanzen zu beobachten.

Cytologische Untersuchung:

Die Mitochondrien wurden mit Janusgrün (Konzentrationsreihe s. S. 41) angefärbt, daher erscheinen sie in den Zeichnungen etwas kontrahiert.

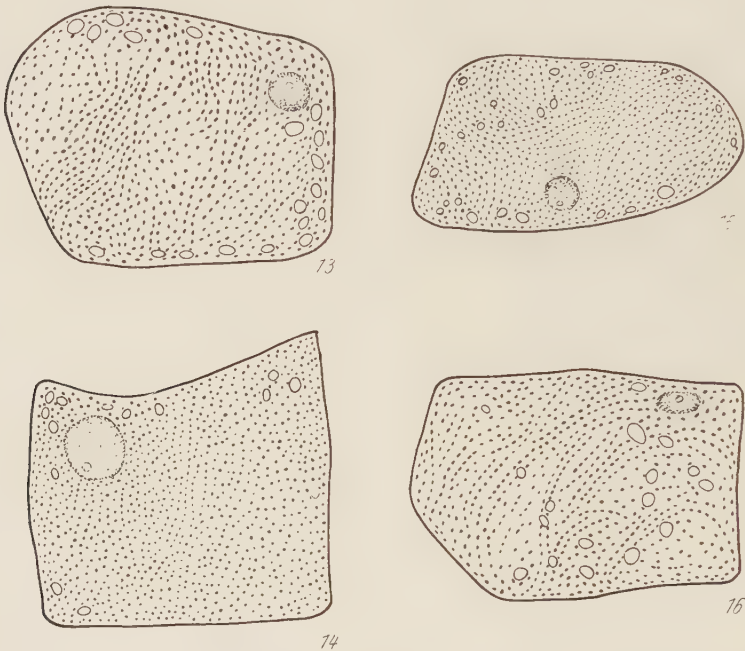


Abb. 13 bis 16. *Bryophyllum daigremontanum*. Dargestellt ist die untere Zelhälfte: Plastiden (weiß) und Mitochondrien (schwarz). 13 Zelle aus dem Rindenparenchym einer Kontrollpflanze. — 14 Zelle aus einem mit IES erzeugten Kallus. — 15 Zelle aus einem mit o-Aminoazotoluol erzeugten Kallus. — 16 Zelle aus dem Rindenparenchym mit p-Dimethylaminoazobenzol behandelt.

Anhand einer Reihe von Abbildungen (Abb. 7 bis 16) sind die wichtigsten Befunde übersichtlich zusammengestellt. Die im Folgenden mit „T“ markierte Nummer gibt die zugehörige Abbildung für *Tomate*, die mit „B“ markierte für *Bryophyllum* an. Sämtliche Zellen stammen aus dem Rindenparenchym oder davon abgeleiteten Teilen. Es ist jeweils nur der Wandbelag der unteren Zelhälfte dargestellt.

a) Normal (Rindenp.): Plastiden grün (T 7 und B 13);

b) IES (aus Kallus): Plastiden nahezu farblos, Mitochondrien vermehrt, kugelförmig (T 8 und B 14);

c) AT (aus Kallus): Plastiden nahezu farblos, Mitochondrien vermehrt, elliptisch (T 9 und B 15);

d) DAB (Rindenp.): Wie AT, aber der Normalform viel näherstehend (T 11 und B 16);

e) AAB (Rindenp.): Plastiden farblos, Mitochondrien nicht (?) vermehrt (T 10);

f) AB (Rindenp.): Plastiden normal, Mitochondrien geschädigt, nicht vermehrt (T 12).

Behandelt man eine Zelle gleichzeitig mit IES und AB, so zeigt sich zwar ein Streckungswachstum, die Mitochondrien werden aber nicht vermehrt. Behandelt man zuerst drei Wochen mit AB und danach mit AB + IES, so tritt auch das Streckungswachstum nicht mehr auf.



Abb. 17 und 18. Stengelstümpfe dekapitierter Exemplare von *Bryophyllum daigremontanum*, mit o-Aminoazotoluol-gesättigter Lanolinpaste behandelt. Bildung von Adventivwurzeln.

Auch bei den cytologischen Untersuchungen zeigte *Bryophyllum* einen schwächeren Effekt als die Tomate.

Diskussion:

Es ließen sich nicht einmal die einzigen bisher in der Literatur vorliegenden, scheinbar positiven Befunde (M. Levine 1959) bestätigen. AT und DAB förderten zwar einige Zeit lang das Wachstum der Kalli an den Stümpfen und sogar die Bildung kleiner Warzen; ein autonomes starkes Wachstum — vergleichbar etwa mit dem der Crown-galls — trat aber nicht ein, trotz der bestmöglichen Behandlungsweisen und monatelanger Einwirkung der Stoffe. Auch die aus Crown-gall-Versuchen abzuleitende Hoffnung, daß ein Zusatz von IES als Hilfsfaktor der Realisierung der Tumorbildung günstig einwirken würde, erfüllte sich nicht. Dagegen brachten die Versuche einige Beobachtungen über interessante Teileffekte:

Bei den Kontrollen können sich aus den Kalli neue Sprosse bilden; nach Einwirkung von DAB und AT wurde dies niemals beobachtet. Diese Stoffe fördern das Kalluswachstum in den ersten acht Versuchswochen.

Wie schon in den anderen Versuchsreihen, erwiesen sich auch hier die cancerogenen Azofarbstoffe weniger giftig als das nichtcancerogene AB, AAB nimmt eine Mittelstellung ein. Erstere erlauben daher die Manifestierung von Effekten, die bei gleicher Konzentration von AB nicht mehr auftreten können.

Die Unterschiede zwischen den cancerogenen Stoffen selbst lassen sich zwanglos durch die verschiedene Wasserlöslichkeit erklären, von der die Menge abhängt, die in das Gewebe aufgenommen wird. BP als der Stoff mit der geringsten Wasserlöslichkeit war unwirksam, DAB weniger wirksam als AT. AS ist nicht nur wegen seiner sehr hohen Wasserlöslichkeit, sondern auch wegen seiner schwach sauren Eigenschaften nicht ohne weiteres zu vergleichen.

Besonders interessant ist die Parallele in der Wirkung von IES einerseits und den cancerogenen Stoffen DAB und AT andererseits. Sie äußert sich nicht nur in den cytologischen Effekten auf Plastiden und Mitochondrien, sondern auch für eine ziemlich lange Zeit (2 Monate!) in der Förderung des Kalluswachstums und der Adventivwurzelbildung (und Zellstreckung?). Die Mitochondrienvermehrung könnte allerdings auch eine sekundäre Folge des durch IES bewirkten Zellwachstums sein, da die Mitochondrienzahl in Korrelation zur Zellgröße steht (siehe Abb. 7 a und b).

Gruppe B

Als Versuchsobjekte dienten *Hedera helix* und eine panaschierte Form von *Tradescantia* (*Tr. anagallidea* cult. *Laekenensis*). Beide Arten lassen sich sehr lange (*Tradescantia* unbeschränkt) als abgeschnittene Zweige in Lösungen kultivieren. *Hedera* behält ihre grünen Blätter auch über den Winter. Die Einwirkung der Substanzen auf die Blätter kann daher infolge der höheren Lebensdauer dieser Organe besonders gründlich studiert werden.

Infolge der langen Versuchsdauer war die Möglichkeit gegeben, in solche Zweige mit dem Transpirationsstrom relativ hohe Mengen der zu testenden Stoffe in langdauernder Darbietung aus verhältnismäßig stark verdünnten Lösungen aufnehmen zu lassen, also gerade die Bedingungen einzuhalten, die bei Mensch und Tier in der chemischen Krebsauslösung von besonderer Bedeutung sind.

Von *Tradescantia* wurde eine panaschierte Form ausgewählt, um eine eventuelle Förderung oder Hemmung einer der beiden Zellsorten durch die Agenzien feststellen zu können.

Von beiden Objekten wurden etwa 20 bis 50 cm lange, wurzellose Zweige in Reagenzgläser gestellt, die mit Agenslösung gefüllt waren. Als Nährlösung diente Leitungswasser mit einem Zusatz von 0.5 g/l Mairöl. Diese Lösung wurde 1 Stunde im Dampftopf sterilisiert und nach dem Abkühlen die einzelnen Stoffe zugesetzt. Die Lösungen in den Gläsern wurden jeden zweiten Tag nach gründlichster Reinigung der Reagenzgläser gegen frisch zubereitete ausgewechselt. Je getesteter Substanz wurden etwa 20 Zweige verwendet; die Kontrollserie hatte denselben Umfang. In den einzelnen Versuchsreihen wurde die Methodik mehrfach variiert, es kann daher eine genaue Beschreibung der Verfahrensweise nur bei den jeweiligen Versuchen mit *Tradescantia* und *Hedera* gegeben werden.

Versuch 1: *Tradescantia*

Die Versuche wurden in der Zeit von Oktober 1958 bis März 1959 in einem nordseitigen Gewächshaus bei 20° durchgeführt. Die geprüften Stoffe wurden als wässrige Lösungen geboten. Die verwendeten Reagenzgläser waren auf der Außenseite zum Schutz gegen photodynamische Schädigung und Veralgung geschwärzt.

Ergebnisse:

DAB. In 0,45 mg/l trat frühestens in der 4. Versuchswoche eine bis zu Versuchsende dauernde schwache Chlorose aller Blätter und eine kaum feststellbare Wachstumshemmung der Sprosse auf; vor allem war die Zahl der gebildeten Wurzeln vermindert. Die Blätter waren durch Anthozyan leicht violett gefärbt.

AT. In 1,8 mg/l war die nach 3 bis 5 Wochen und später erscheinende Chlorose so stark, daß die Panaschierung nicht mehr zu erkennen war. Die Blätter waren von normaler bis leicht reduzierter Größe, durch Anthozyangehalt gefärbt. An Sprossen mit solchen Blättern war das Wachstum vollkommen gestoppt. Das Wurzelwachstum war kaum gehemmt, die Zahl der gebildeten Wurzeln vermindert.

AAB. In einer **vollgesättigten** Lösung (7,4 mg/l) sind die Internodien stark gestaucht und die Blattspreiten reduziert; das Wachstum der Sprosse ist stark gebremst. Wurzeln werden nicht mehr gebildet. In den Blättern tritt aber keine Chlorose auf, diese sind vielmehr tief violettgrün.

Eine $\frac{1}{3}$ -**gesättigte** Lösung (also 2,5 mg/l) erzeugt nach 5 bis 6 Wochen Behandlungszeit dagegen Chlorose. Die Blätter sind normal groß und stark anthozyanhaltig. Das Wachstum von Sprossen mit solchen Blättern war gestoppt; die Zahl und das Wachstum der Wurzeln war stark vermindert.

AS erzeugt in einer Konzentration von 1 mg/l nach 4 Wochen ziemlich starke Chlorose an den neugebildeten Blättern. Jedoch waren die 6 Wochen nach Versuchsbeginn erschienenen Blätter von normalem Aussehen.

Eine Steigerung der Konzentration in der 7. Versuchswoche auf 1,5 mg/l bewirkte in der 9. bis 11. Versuchswoche (also bereits nach 3 Wochen) eine erneute Chlorose der Pflanzen. In der 15. Versuchswoche — nach Abklingen der Chlorose — wurde die Dosis auf 2,6 mg/l gesteigert; es trat nur noch eine leichte Chlorose auf, und die Pflanzen nahmen das gleiche Aussehen wie in „vollgesättigter“ AAB-Lösung an. Das Wachstum, auch der Wurzeln, war in keinem Fall stark gehemmt. Nach 4 Wochen Behandlungsdauer mit der höchsten Konzentration starben zwei Pflanzen ab. Hält man dagegen die Pflanzen konstant in einer Konzentration von 1 mg/l, so zeigen sie nach etwa 10 Tagen Chlorose wieder die gleich intensive Grünfärbung aller Blätter wie die Kontrolle.

Im Verlauf der Chlorose ergibt sich ein wichtiger Unterschied zwischen AS und den Azofarbstoffen. Wird die Chlorose durch AS erzeugt, so ist sie kompensierbar und leicht reversibel; die chlorotischen Pflanzen sind in ihrem Wachstum kaum behindert. Ganz anders verhält sich eine durch die verwendeten Azofarbstoffe erzeugte Chlorose. Die stark chlorotischen Pflanzen sind in ihrem Wachstum vollkommen gestoppt. Die Chlorose selbst ist von sehr hartnäckiger Beständigkeit. Stellt man nämlich eine Pflanze aus

AT-Lösung in Kontrolllösung ein, so können zwar die neugebildeten Blätter sofort ergrünen, nicht aber die chlorotischen. Diese zeigen erst nach etwa 6 bis 8 Wochen einen grünen Anflug. Die relative Harmlosigkeit der Stoffe beweist die Tatsache, daß es möglich ist, die Pflanzen monatelang in AT-Lösung in diesem stark chlorotischen Zustand lebend zu erhalten. Ferner kann die Wachstumshemmung, welche an den stark chlorotischen Pflanzen aufgetreten war, nicht durch „Nahrungsmangel“ bedingt sein, sondern nur durch die Wirkung des applizierten Stoffes, denn die auswachsenden Seitentriebe entarten erst nach Bildung einiger grüner Blättchen ebenfalls chlorotisch und werden zugleich in ihrem Wachstum gestoppt. Dabei kann es manchmal vorkommen, daß die Spitze eines Blattes normal gefärbt ist, während der Blattgrund vollkommen weiß erscheint.

Eine Verschiebung der Panaschüre zugunsten der grünen oder blassen Bezirke konnte nicht beobachtet werden. Eine differentielle Förderung oder Hemmung einer der beiden Zellsorten oder einseitige Selektion war also nicht eingetreten.

Versuch 2: *Hedera*

Material und Methodik:

Dieser Versuch wurde in zwei aufeinanderfolgenden Jahren, von Februar bis September 1958 und März bis September 1959, in einem nordseitig gelegenen Gewächshaus bei 15—20° durchgeführt.

Geprüft wurden in der Versuchsserie 1958 die Stoffe AT und DAB. Tween 20 bewährte sich nicht als Lösungsvermittler, daher wurden die Stoffe in 0,2%iger alkoholischer Suspension geboten. Die Nährlösung wurde nach einstündiger Sterilisation im strömenden Dampf abgekühlt und zu 1 l Nährlösung 2 ml einer gesättigten Alkohollösung des jeweils erforderlichen Stoffes zugesetzt. Es handelt sich also um eine gesättigte Agenslösung in 0,2%iger alkoholischer Lösung, in der noch ein erheblicher Teil der Substanz in feinsten Verteilung suspendiert war. Angesetzt wurden pro Stoff 22 Sprosse sowie als Kontrolle 25 Exemplare in 0,2% alkoholischer Nährlösung.

In der Versuchsreihe 1959 wurden die Stoffe AAB, DAB, AT und AS in wässriger, das nicht-krebserzeugende AB in 0,2%iger alkoholischer Lösung geboten; hinzu kam noch je eine Kontrollserie in Nährlösung und 0,2%iger alkoholischer Nährlösung. Der Stoff AAB wurde in zwei Konzentrationsstufen unterteilt, einmal vollgesättigt (100%) und zu einem Viertel gesättigt (25%). Für die Versuchsreihe mit AS und ABB wurden jeweils 20 Individuen verwendet, dabei wurde die Serie AAB 100% unterteilt: 10 Individuen wurden 16 Tage in agenshaltige Lösung und darauf folgend in Nährlösung gebracht, die übrigen zehn erhielten Dauerbehandlung. Von DAB und AT wurden jeweils nur zehn Exemplare angesetzt.

Da die Lösungen, insbesondere die mit Alkoholzusatz, eine starke Neigung zu Verunreinigung zeigten, wodurch die unter Wasser befindlichen Pflanzenteile innerhalb kurzer Zeit in Fäulnis übergehen, mußten sie ständig erneuert werden. Im vorliegenden Versuch geschah dieses — wie bei *Tradescantia* — jeden zweiten Tag. Die Pflanzen wurden zu diesem Zweck aus den Reagenzgläsern genommen und unter dem kräftigen Strahl einer Wasserstrahlpumpe abgespült. Ebenso wurden die Reagenzgläser mit einer Bürste gründlichst gereinigt und die Pflanzen in den mit frischer Lösung gefüllten Behälter wieder eingestellt.

Zur weiteren Beobachtung wurden sämtliche Individuen nach Ablauf der angegebenen Versuchszeit in Erde verpflanzt und mindestens fünf Monate lang weiter gezogen.

Im Gegensatz zum Tier ist die höhere Pflanze nicht befähigt, den gebotenen Stoff laufend auszuschcheiden. Daher war es hier möglich, aus der Messung der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge mit hinreichender Genauigkeit die Gesamtmenge des aufgenommenen, cancerogenen Stoffes zu errechnen. Dies geschah für jede Versuchspflanze durch fortlaufende Registrierung der aus den Reagenzgläsern verschwundenen Flüssigkeitsmenge gelegentlich der Erneuerung der Lösungen, selbstverständlich unter Abzug der Verdunstung (gemessen an gleichartigen Gläsern ohne Zweig).

Ergebnisse

Habitus der Pflanzen

Sämtliche Pflanzen der **Kontrollreihen** — sowohl in alkoholischer wie in alkoholfreier Nährlösung — wiesen eine normale Entwicklung auf. Die Blätter der Pflanzen in alkoholischer Nährlösung zeigten einen gerade noch erhabenen Geruch nach Alkohol. Vermutlich wurde ein Teil des Stoffes auf diesem Wege aus der Pflanze entfernt.

AT. Das Spitzenmeristem aller Pflanzen war mit Beginn des 4. Monats der Behandlung so stark gehemmt, daß kein einziges neues Blatt mehr gebildet werden konnte. Eine Verkrüppelung der neugebildeten Blätter war nur vereinzelt aufgetreten.

In der Wirkung des Stoffes auf die Blätter lassen sich zwei zeitlich verschiedene Phasen unterscheiden. Die erste Phase („Sofortwirkung“) tritt kurzzeitig vor der Tumorbildung auf, die zweite Phase („Spätwirkung“) erst einige Monate nach Abschluß der Behandlung. Als Sofortwirkung zeigten sich auf den Blättern einiger Pflanzen, vor allem in den Interkostalfeldern, punktförmige weißliche Flecken, die bevorzugt zunächst an den jüngeren Blättern auftreten. Als Spätwirkung tritt dieselbe Erscheinung massenhaft auch an den älteren Blättern auf (in den beobachteten Fällen etwa 1 Jahr nach Behandlungsbeginn — die Pflanzen waren bereits 4 Monate auf Erde gezogen worden). Dieser letzte Effekt ist sehr ausgedehnt und verleiht den Pflanzen ein Aussehen, das einer Viruskrankheit ähnlich ist. Die Zerstörungen umfassen vor allem die zweite Palisadenschicht. Die Chloroplasten sind in den weißlichen Bezirken degeneriert. Die Abb. 19 soll dies veranschaulichen; sie zeigt eine normale und eine geschädigte Zelle samt den Plastiden.

DAB hemmt das Wachstum des Spitzenmeristems stärker als AT. Eine Sofortwirkung auf die Chloroplasten der Blätter während der Behandlung

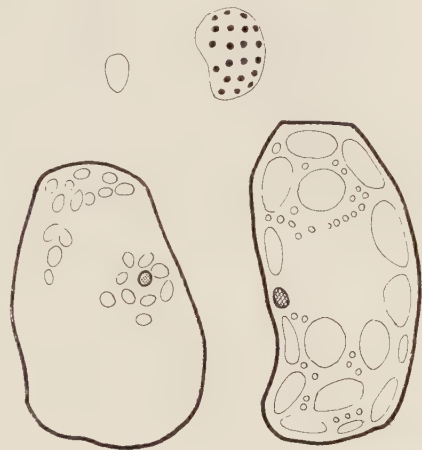


Abb. 19. Zellen aus dem Palisadenparenchym der Blätter von *Hedera helix*. Rechts: Kontrollpflanze, links: nach Behandlung mit o-Aminoazotoluol. Darüber die zugehörigen „Chloroplasten“.

konnte nicht festgestellt werden. Es muß an dieser Stelle aber betont werden, daß der Fluoreszenztest an den Blättern bei dieser Substanz in beiden Konzentrationen (alkoholfreie — WÄSS in Tab. 7 — und alkoholische — ALK — Nährlösung) versagte; daher wäre es denkbar, daß höchstens Spuren von DAB in die Blätter gelangt waren, denn diese zeigten sämtlich eine schwach chlorotische Verfärbung. Die Spätwirkung auf die Plastiden nach Verpflanzung auf Erde war bei weitem nicht so intensiv ausgebildet wie in AT.

Tabelle 7.

Nr.	I		II	III	IV		V	VI	VII	VIII
	Stoff	Lös.	Jahr	Aufn./Pfl. in ml/d	Lös. mg/l	konz. $M \cdot 10^{-6}$	Grenz- dosis	Behandl.- zeit (Tg.)	Tumor %	Aufn./Pfl. in $M \cdot 10^{-6}$
1 a	AT	WÄSS	1959	0,52	1,8	8	0,48	115	33	0,9
b		ALK	1958	0,83	2,4	10,7		85	45	1,79
2 a	DAB	WÄSS	1959	0,83	0,46	2,4	0,23	135	10	0,35
b		ALK	1958	0,8	2,1	9,35		82	60	1,49
3 a	AAB 100%	WÄSS	1959	0,85/0,33	7,41	37,4		16 + 18	33	2,41
b	25%	WÄSS	1959	0,38	1,85	9,35	0,27	88	20	0,76
4	AS	WÄSS	1959	0,85	1,0	8	0,28	33	10	1800
5	AB	ALK	1959	0,97	0,45	2,27	0,33	123	5 (+)	0,27
6 a	—	WÄSS	1959	1,24						
b	—	ALK	1958	0,85	1440	43478	—			$7,3 \cdot 10^4$
c	—	ALK	1959	0,99	1440	43478	—			$5,2 \cdot 10^4$

AAB 100% stoppt das Wachstum des Spitzenmeristems innerhalb weniger Tage Behandlungsdauer; neue Blätter werden daher nicht getrieben. Die schon vor Versuchsbeginn vorhandenen Blätter vergilben langsam innerhalb von vier Monaten Behandlungszeit und werden abgestoßen.

Behandelt man mit dieser Konzentration nur 16 Tage und bringt die Pflanzen dann anschließend in Nährlösung, so beobachtet man dieselben Erscheinungen, wie sie nachfolgend unter 25% beschrieben werden.

AAB 25% hemmt das Wachstum des Spitzenmeristems so nachhaltig, daß während der ganzen Behandlungszeit fast keine neuen Blätter mehr gebildet werden können. Die wenigen, die während der Behandlung getrieben wurden, waren alle stark chlorotisch. An den schon vorhandenen Blättern erzeugte diese Konzentration als Sofortwirkung in den Interkostalfeldern eine gelbliche, punktiert verteilte Verfärbung. Das Auftreten dieses Effektes ist von der Größe der Flüssigkeitsaufnahme abhängig und daher nur auf wenige Individuen beschränkt. Eine Spätwirkung nach Verpflanzung auf Erde konnte nicht beobachtet werden.

AS behindert das Spitzenmeristem in seinem Wachstum nur sehr schwach. Alle neugebildeten Blätter zeigten Chlorose, ergrünt aber später

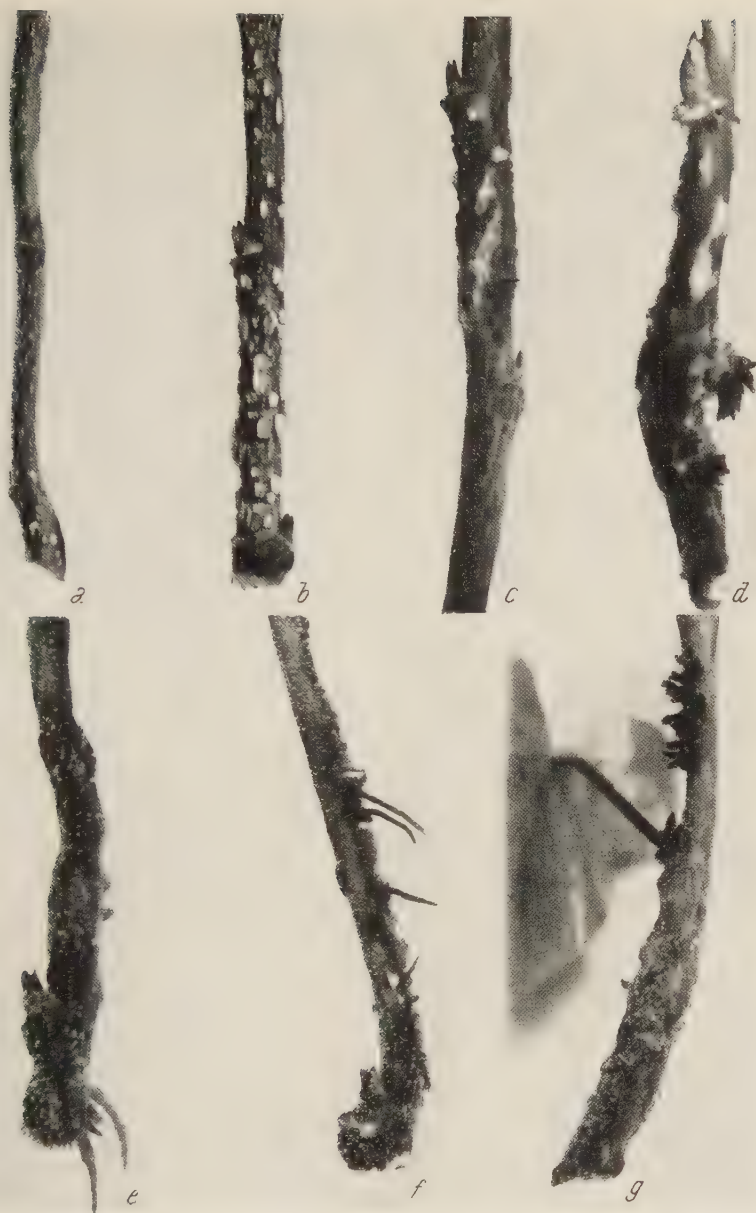


Abb. 20. *Hedera helix*, submers gehaltene Stengelpartien. *a* Nährlösung (normale Lentizellenbildung — auch in 0,2% Alkohol). — *b* In wässriger Lösung von p-Dimethylaminoazobenzol (gesteigerte Parenchymbildung; Beginn des Anschwellens des Stengels — Tumor). — *c* 16 Tage in gesättigter Lösung von p-Aminoazobenzol und anschließend in Nährlösung (schwache Anschwellung). — *d* In arseniger Säure (Stengel angeschwollen — reifer Tumor). — *e* Reifer Tumor in alkoholischer Lösung von p-Dimethylaminoazobenzol. Tumor des Stengelparenchyms. — *f* Reifer Tumor in alkoholischer Lösung von o-Aminoazotoluol. Tumor des Blattpolsters. — *g* Reifer Tumor in alkoholischer Lösung von o-Aminoazotoluol („Sekundärtumor“ etwa drei Wochen nach Abtrennen des ersten Tumors).

wieder normal. Nahezu gleichzeitig an allen Blättern tritt als Sofortwirkung eine in den Interkostalfeldern lokalisierte, punktförmige, weißliche Verfärbung auf. Auch diese Blatteile ergrünen sehr bald wieder (bei den Azofarbstoffen dauert dieser Vorgang wochenlang!). Eine Spätwirkung nach Verpflanzung auf Erde konnte nicht beobachtet werden.

Sämtliche im vorstehenden aufgeführten Effekte, einschließlich der Hemmung des Spitzenmeristems, waren reversibel; nach Verstreichen einer gewissen Frist zeigten die neugebildeten Blätter, falls die Behandlung eingestellt worden war und die Pflanzen auf Erde gezogen wurden, eine vollkommen normale, gleichmäßige Färbung.

AB. Das Spitzenmeristem stellte sehr rasch seine Tätigkeit ein und begann in der 5. Woche der Behandlung abzusterben. Nach zwei weiteren Wochen wurden die Blätter abgestoßen, die neu austreibenden Seitensprosse stellten nach Ausbildung eines Blattes das weitere Wachstum ein und starben ebenfalls ab. Nach 90 Tagen Behandlungszeit waren nur noch fünf von zwanzig Pflanzen am Leben. Zu Versuchsende (123. Tag) war auch die letzte Pflanze eingegangen. Die wenigen neugebildeten Blätter waren normal grün, besaßen aber eine reduzierte Spreite und wiesen oft Verkrümmungen und Verkümmern der Blattspreite auf.

Tumorbildung

Die Abnormalitäten, welche hier als „Tumoren“ bezeichnet werden, treten nur an den untergetauchten Stengelpartien auf. Bevorzugter Sitz sind die Blattpolster, wahrscheinlich wegen ihres Parenchymreichtums; aber auch an den Internodien sind diese Entartungserscheinungen aufzufinden.

Die Tumoren leiten sich von den Lentizellen ab. Die ersten Entwicklungsstadien gleichen völlig denen an den Kontrollpflanzen. Aus kleinen Warzen werden Längsrisse, die sich zu Lentizellen erweitern. Während aber bei den Kontrollen diese Lentizellen bald nicht mehr weiter an Größe zunehmen, sondern nur an Zahl, entwickeln sie sich in Agenslösung, wie dies in Abb. 20 *b* zu sehen ist. Die Reste der Warze klaffen unter Fortsetzung der anfangs erwähnten Rißbildung. Zur gleichen Zeit beginnt die Umgebung anzuschwellen, wodurch sich die Risse (zu Spalten) vergrößern (Abb. 20 *d*). Im Endstadium weist der submerse Stengelteil den doppelten bis dreifachen Umfang auf. Seine Oberfläche ist dann von etwa 1 cm langen Spalten und warzenartigen Protuberanzen bedeckt und bräunlich verfärbt. Besonders charakteristisch tritt dieser Zustand bei Behandlung mit DAB und AT auf (Abb. 20 *e, f, g*). In AS bleiben die Stengel normal grün, die Warzen sind kaum ausgeprägt (Abb. 20 *c*), wahrscheinlich deshalb, weil der Tumor sehr frühzeitig auftritt, denn schon wenige Tage nach Erscheinen der ersten Warzen beginnt der Stengel anzuschwellen.

Von jedem der getesteten Stoffe wurde wenigstens ein Tumor erzeugt. Den jeweiligen Zeitpunkt des erstmaligen Erscheinens gibt Kolonne VI der Tab. 7, S. 76 an. In dieser Tabelle sind die Versuchsdaten übersichtlich zusammengestellt. Die Angaben für die aufgenommenen Substanzmengen (Kol. VIII) sind in Mol. 10^{-6} gehalten, um einen Konzentrationsvergleich

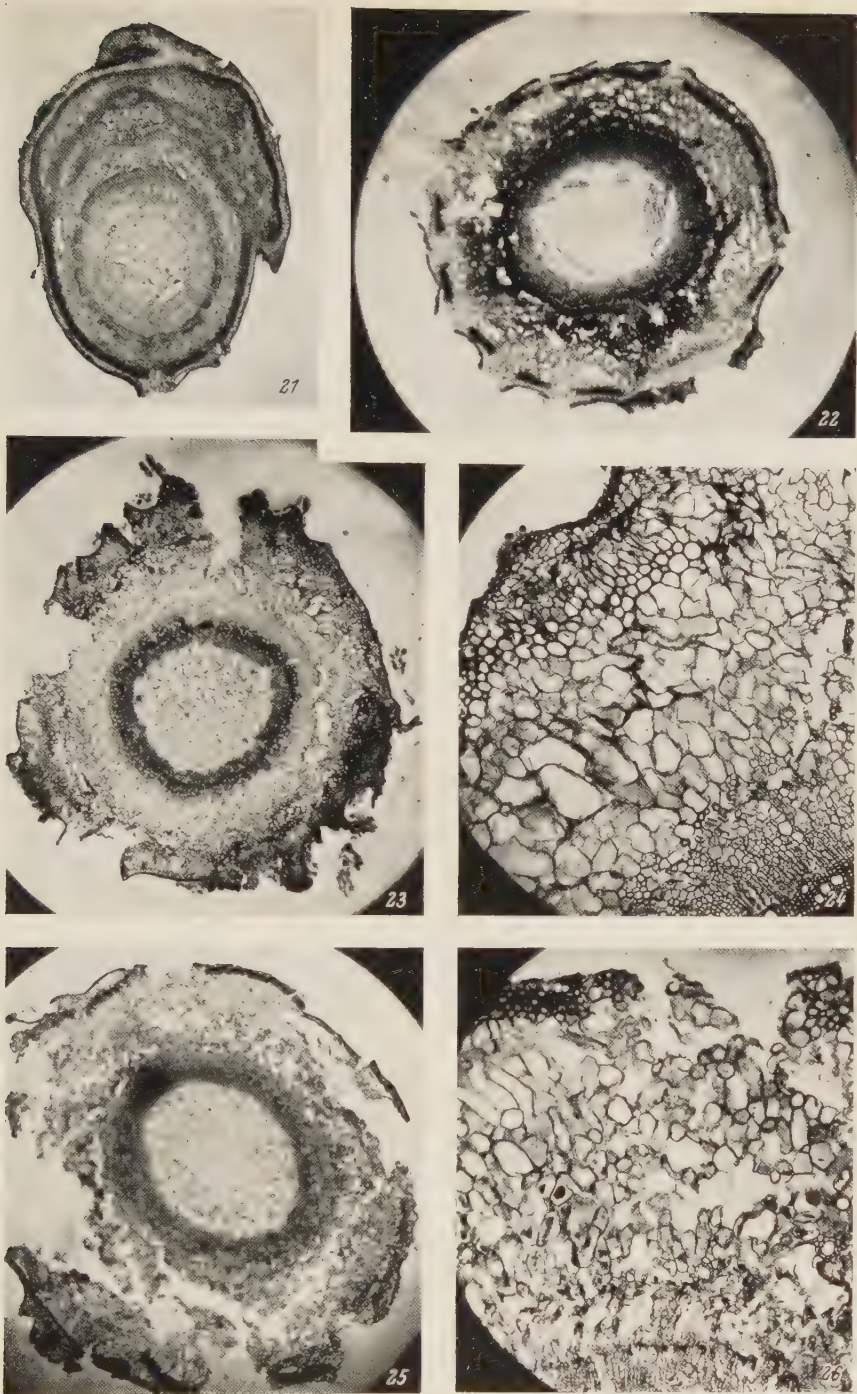


Abb. 21 bis 26. Querschnitte durch den submers gehaltenen Teil von Stengeln von *Hedera helix*. 21 Kontrolle. — 22 in 1 mg/l arseniger Säure. — 23 in wässriger Lösung von o-Aminoazotoluol (1,8 mg/l); Spaltenbildung durch Streckung des Rindenparenchyms. — 24 Ausschnitt von Abb. 23. — 25 in 0,2%iger alkoholischer Lösung von Azobenzol (0,45 mg/l). — 26 Ausschnitt von Abb. 25.

durchführen zu können. Die Grenzdosis (V) scheint für alle Stoffe in der Größenordnung von 0,25 bis $0,55 \times 10^{-6}$ Mol zu liegen (der Wert für AT ist zu hoch, es sind nämlich mehrere Tumoren bei dieser Konzentration aufgetreten), diese Menge an AB ist aber bereits für die Pflanze letal (VII, 5).

Damit in AAB 100% ein Tumor gebildet wird, ist es allerdings notwendig, die Zweige nur 16 Tage zu behandeln (Aufn./Pfl. Tab. S. 76 III 3 a, linke Zahl) und sie dann in Nährlösung zu stellen (Aufn./Pfl. III 3 a, rechte Zahl). Beläßt man dagegen die Pflanzen in der vollgesättigten Lösung über die ganze Versuchszeit, so unterbleibt jegliche Aktivität am Stengel. In AAB 25% tritt dagegen bei Dauerbehandlung ein Tumorstadium ein.

Das abweichendste Resultat liefert **AB**. Die Anfangsstadien der Lentizellenbildung waren stark verzögert. Nach 125 Tagen Behandlung zeigte die letzte noch lebende Versuchspflanze sehr deutliche Absterbeerscheinungen. Der an ihrem Stengel ausgebildete Tumor hatte ungefähr einen Entwicklungszustand erreicht, wie ihn Abb. 20 b darstellt. Die submerse Stengelpartie unterschied sich oberflächlich betrachtet kaum von der der Kontrollpflanzen, wies aber doch hier und da klaffende Warzen auf, ein Stadium, welches der Tumorbildung gewöhnlich voranzugehen pflegt. Die übrigen Pflanzen zeigten diese Erscheinungen nicht, da sie zum Teil schon vor der Ausbildung von Lentizellen abgestorben waren. Die einzige „überlebende“ Pflanze stand also im Anfangsstadium des Entwicklungsganges.

Es ist leicht erkennbar, daß das abweichende Verhalten nach Einwirkung von AB (und AAB 100%) eine Folge der größeren Toxizität dieser Stoffe ist. Die Entstehung von Tumoren, wie sie in AT und DAB erhalten werden, ist ein langsam fortschreitender, monatelang dauernder Prozeß, der eine gewisse Vitalität der Pflanze voraussetzt. Ist diese durch zu starke Giftigkeit des Agens geschwächt, so stirbt die Pflanze, ohne daß der Tumor eine nennenswerte Größe erreicht hat. Dies ist bei AB und — in geringerem Maße — bei AAB 100% nach zu langer Einwirkung der Fall.

Die zeitliche Verteilung der oben beschriebenen Vorgänge läßt erkennen, daß der Teilungsreiz, der bei der Lentizellenbildung auftritt, für die Entstehung der Tumoren eine wesentliche Rolle spielt; so wurde niemals an einer Pflanze ein Tumor zeitlich vor der Lentizellenbildung beobachtet. Dagegen hängt der Beginn der Tumorbildung von der Konzentration des gebotenen Agens und der aufgenommenen Flüssigkeitsmenge ab.

Eine interessante **Variation der Versuchsanordnung** besteht darin, daß man die Zufuhr an cancerogenem Agens (wichtig: niedere Konzentration!) während der Phase des Anschwellens der Stengelpartien abstoppt, indem man die Pflanze in Nährlösung einstellt und letztere mehrfach wechselt, diese Maßnahme hat sofortigen Wachstumsstillstand der Stengelpartien zur Folge. Die Tumoren werden also nicht selbständig, ihr Wachstum ist von einer dauernden Zufuhr an Agens abhängig.

Schneidet man einen Tumor ab, so bildet sich, falls man die obere, normal erscheinende Partie wiederum in Agenslösung stellt, innerhalb von etwa 4 Wochen bereits ein fast vollausgereifter „Sekundärtumor“; in Abb. 20 g ist ein solcher dargestellt.

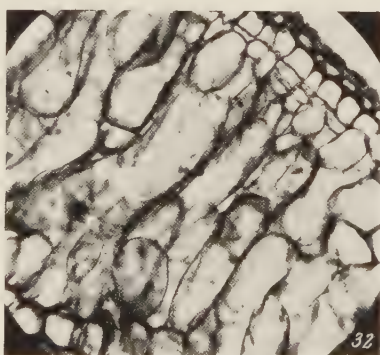
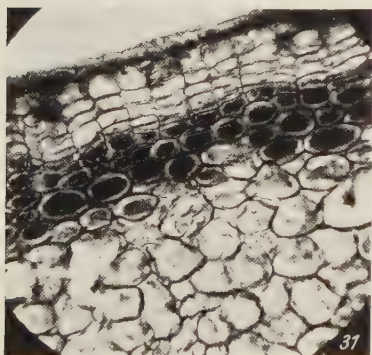
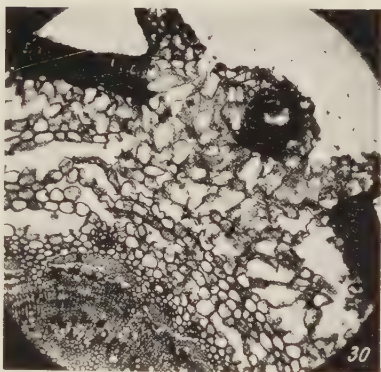
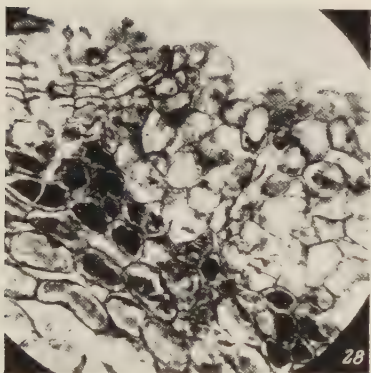
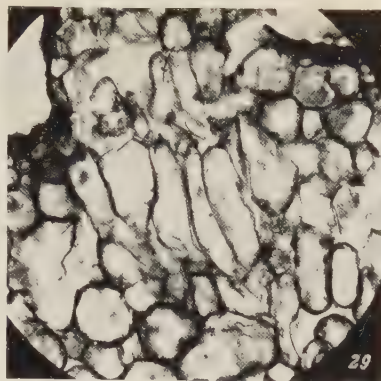
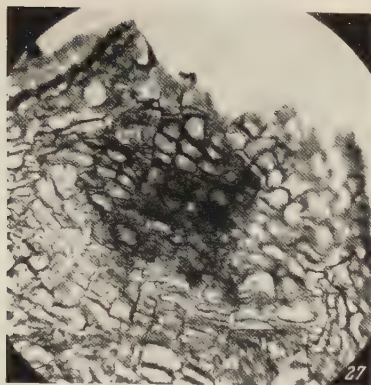


Abb. 27 bis 32. Querschnitte an submers gehaltenen Stengelteilen von *Hedera helix*. 27 Kontrolle; junges Stadium einer Lentizelle (in 0,2% Alkohol) — 28 Kontrolle; Endstadium einer Lentizelle (in Nährlösung). — 29 o-Aminoazotoluol (in 0,2%iger alkoholischer Lösung = 2,4 mg/l); Streckung des Kambiums einer Lentizelle. — 30 p-Aminoazobenzol, 25% gesättigt (1,85 mg/l); der gleiche Vorgang wie in Abb. 29. — 31 Kontrolle; Korkkambium (in Nährlösung). — 32 o-Aminoazotoluol (1,8 mg/l); „Korkkambium“, gestreckt.

Histologie und Cytologie der Tumoren

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Tumoren in Champys Gemisch⁵ fixiert und nach dem üblichen Verfahren in Paraffin eingebettet. Zur Anfertigung der Querschnitte eignete sich jedoch die gewöhnliche Methode nicht. Die Härteunterschiede zwischen dem Xylem und dem Paraffin waren zu groß, die Schnitte wurden stets zusammengeschoben und das Xylem zerfetzt. Um diesem Mißstand abzuhelpen, wurden nach einer Anweisung aus den Mikrotomnachrichten (Heft 1, 1958) ein Stück Tesafilm auf den Block geklebt. Dadurch wurde beim Schneidevorgang jedwede Verzerrung ausgeschlossen und der Schnitt zeigt originalgetreu und lagerichtig alle Einzelheiten. Nach mehrfachen eigenen Versuchen erwies sich als beste Methode zur Übertragung der Schnitte vom Tesafilm auf den Objektträger ein einfaches Aufkleben auf eine vorher zum Rauchen erhitzte dicke Schicht Eiweißglycerin. Dabei wird der Film mit der klebenden Seite (auf der sich der Schnitt befindet) sanft in das Glycerineiweiß eingedrückt, so daß dieses außen über den Film fließt. Hiermit wird vermieden, daß sich Luftblasen unter dem Film befinden. Nachfolgend wird 3 bis 5 Tage bei 60° getrocknet. Der Film wird abgelöst, indem man eine Ecke mit der Pinzette festhält und einen Tropfen Xylol zwischen Film und Objektträger gibt. Solange der Objektträger noch warm ist, löst sich der Film durch den geringen Zug, welchen der Objektträger ausübt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin nach Ehrlich⁵ gefärbt und zu Dauerpräparaten verarbeitet.

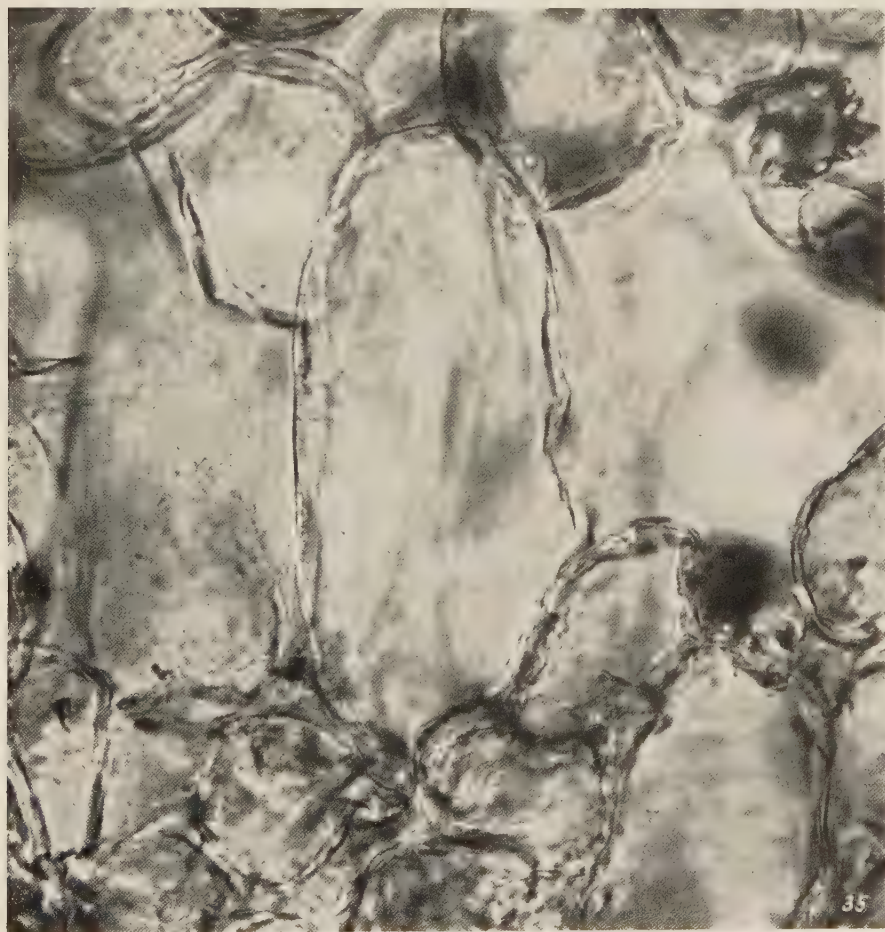
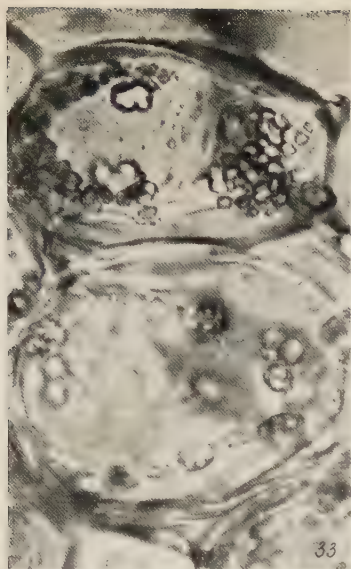
Histologische Befunde:

An den Kontrollen läßt sich der normale Vorgang bei der **Lentizellen-**bildung rekonstruieren (Alkohol hat sichtlich keinen Einfluß auf die Lentizellenbildung!). In Abb. 27 ist eine etwa 7 Wochen alte Lentizelle dargestellt: das Kambium ist deutlich zu erkennen. Ein altes Stadium gibt Abb. 28: hier ist das Kambium in Auflösung begriffen, es finden sich nur mehr vereinzelt Zellteilungen. Das Innere der Lentizelle besteht aus locker liegenden Zellen, die einen Anschluß an das Rindenparenchym herstellen. Dadurch wird normalerweise eine günstigere Versorgung mit Sauerstoff erreicht. In der vorliegenden experimentellen Anordnung verbessert aber jede neu geschaffene Öffnung den Grad der Imbibierung des Parenchyms und damit der Zufuhr an Agens. Der äußere Anreiz zur Neubildung von Lentizellen bleibt über die ganze Versuchszeit erhalten.

An den behandelten Exemplaren zeigt sich als auffallendste Abweichung bei der Lentizellenbildung ein Streckungswachstum der kambialen Zone (Abb. 29 und 30), wobei dieser Vorgang langsam auf das Rindenparenchym übergreift. Die Tumoren befinden sich zu diesem Zeitpunkt in dem Entwicklungszustand, wie er in Abb. 20 b dargestellt ist.

⁵ B. R o m e i s, Mikroskopische Technik, Leibniz Verlag, München 1948.

Abb. 33 bis 35. Zellen aus dem Rindenparenchym des submers gehaltenen Stengel-
teiles von *Hedera helix* (Lebendaufnahme). 33 Kontrolle in 0,2% Alkohol. — 34 in
1 mg/l arseniger Säure. Im linken Teil Mitochondrien einer darüberliegenden Zelle
zu sehen. — 35 in 0,2%iger alkoholischer Lösung von o-Aminoazotoluol (2,4 mg/l).
Gruppe radial gestreckter Zellen.



Infolge der radialen Streckung des Rindenparenchyms treten an den peripheren Schichten große Spalten auf, die wiederum der Ausgangspunkt von Streckungsherden werden können (Abb. 23 und 24). Auf dieser Entwicklungsstufe nimmt der Tumor ein Aussehen an, wie es in Abb. 20 *d, e, f* und *g* dargestellt ist.

Wird die Konzentration an Agens so gewählt, daß die Zeit der Behandlung bis zum Auftreten eines Tumors 3 Monate und länger beträgt, so kann die Pflanze in ihrem submers gehaltenen Teil sich mit einem **Korkmantel** umgeben. Dieser ist in der Kontrolle normal ausgebildet (Abb. 31). Behandelt man die Pflanzen während der ganzen Zeit mit AT oder DAB (in AAB 25% unterbleibt die Korkbildung ganz!) so kommt es in diesem Fall nicht zu geschlossener Korkbildung, sondern die kambiale Zone streckt sich (Abb. 32).

Nur Andeutungen der eben geschilderten Effekte ergeben sich mit **AB**. Die Streckung ist wenig ausgeprägt und beschränkt sich auf die äußeren Parenchymschichten. Die Abb. 26 stellt eine vollausgebildete Lentizelle dar. Es sind nur wenige gestreckte Zellen darauf zu erkennen; sehr umfassend aber ist das Gebiet der toten Zellen in der Mitte. Dieser Befund erklärt, warum der betreffende Tumor — es hatte ja nur eine Pflanze „überlebt“ — sich niemals weiter entwickeln kann.

Cytologische Befunde:

Die durch Streckungswachstum aus normalen Parenchymzellen bzw. Kollenchymzellen (unter Entdifferenzierung der Zellwand) hervorgehenden „Tumorzellen“ weisen eine äußerst zarte Zellwand auf. Das Streckungswachstum geschieht unter Vergrößerung der Vakuole, der plasmatische Wandbelag wird dabei dünner. Die Mitochondrien des Wandbelages vermehren sich während dieses Zellwachstums in einem solchen Maß, daß die Beziehung zwischen Mitochondrienzahl und Zellgröße erhalten bleibt (vgl. S. 72). Die Färbbarkeit dieser Zellorganelle mit Janusgrün B ist stets gut. (Eine Ausnahme bildet AB; bei Behandlung mit diesem Stoff wird die Vermehrung der Mitochondrien verzögert und ihre Färbbarkeit bedeutend herabgesetzt. Es treten an ihnen deutliche Zeichen einer Schädigung auf.) In den Abb. 36 mit 41 ist die Vermehrung der Mitochondrien bei der Zellstreckung dargestellt. Chloroplasten finden sich nur zu Beginn der Zellstreckung bei den mit AS erzeugten Tumorzellen (Abb. 34), bei den mit den Azofarbstoffen erzielten liegen nur noch farblose Degenerationsformen vor, die oft kleiner als ein Mitochondrium sind (Abb. 35). Auch Alkohol verursacht eine Schädigung der Chloroplasten (Abb. 33 und 38), diese Substanz besitzt aber keine Wirkung auf das Zellwachstum.

Diskussion:

Durch die verwendete Technik war es möglich, eine sich über Monate hinziehende chronische Aufnahme von insgesamt mehr als 0,1 mg an cancerogenen Azofarbstoffen pro Zweig zu erreichen. Die partiell submerse Behandlung mit ihrer erschwerten Sauerstoffversorgung sollte eine even-

tuelle Cancerisierung erleichtern. Behandlung und Beobachtung wurden auf über 11 Monate ausgedehnt. Trotzdem war es nicht möglich, einen etwa den Crown-galls an Größe entsprechenden und autonom wachsenden Tumor zu induzieren. Was in der vorliegenden Versuchsserie als „Tumor“ bezeichnet

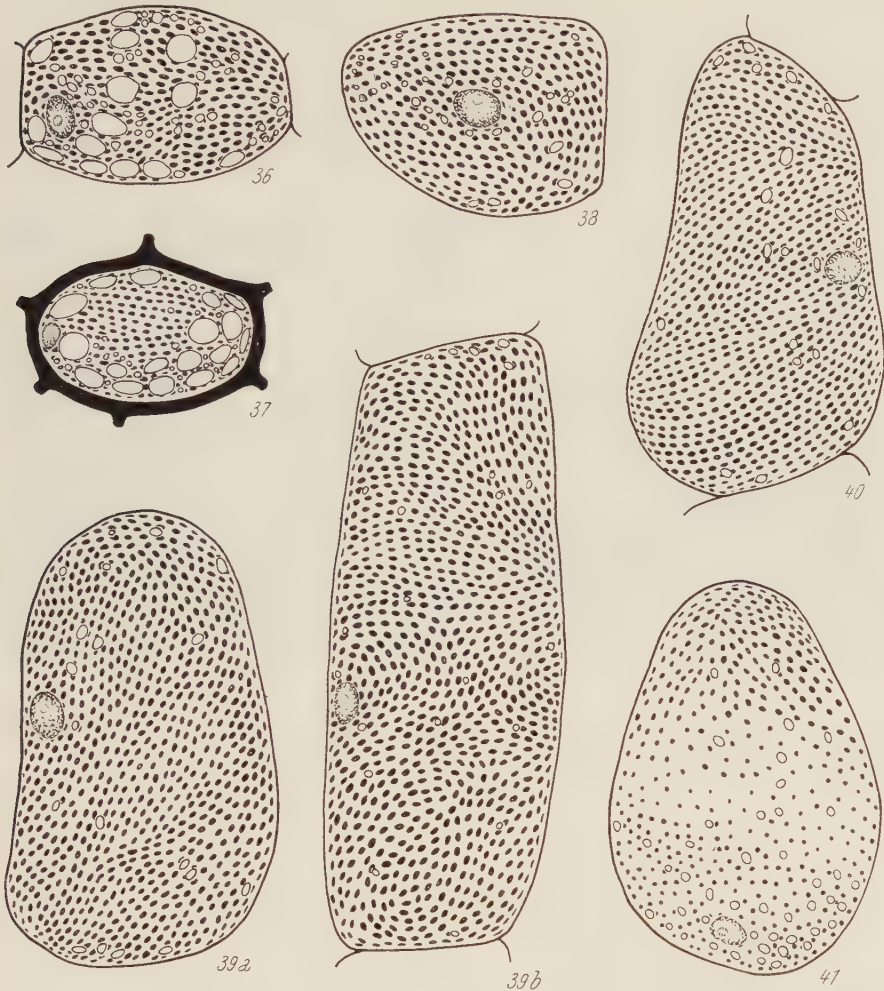


Abb. 56 bis 41. Zellen aus dem submers gehaltenen Stengelteil von *Hedera helix*. Dargestellt ist die untere Zellhälfte, Plastiden (weiß) und Mitochondrien (schwarz). — 36 Zelle aus dem Rindenparenchym einer Kontrollpflanze in Nährlösung. — 37 Zelle aus dem Kollenchymmantel einer Kontrollpflanze in Nährlösung. — 38 Zelle aus dem Rindenparenchym einer Kontrollpflanze in 0,2%iger alkoholischer Lösung. — 39 Zellen aus dem Rindenparenchym mit wässriger Lösung von o-Aminoazotoluol behandelt (mit zunehmender Zellstreckung schreitet die Entdifferenzierung der Plastiden fort; die Vermehrung der Mitochondrien ist nicht beeinträchtigt). — 40 Zelle aus dem Rindenparenchym mit p-Dimethylaminoazobenzol in wässriger Lösung behandelt. — 41 Zelle aus dem Rindenparenchym in 0,2%iger alkoholischer Lösung von Azobenzol.

wurde, macht zwar äußerlich den Eindruck einer Gewebswucherung und -entartung; es ist aber fraglich, ob diese Bildungen als — noch nicht autonome — Vorstufen pflanzlichen Krebses angesprochen werden dürfen, geschweige denn etwas mit tierischem Krebs zu tun haben. Es fehlt nämlich gerade die für die Entwicklung einer „echten“ Krebsgeschwulst so typische hohe Teilungsaktivität in den Efeu-„tumoren“ völlig; sie „wachsen“ vielmehr durch Zellstreckung und das nur begrenzt.

Immerhin ist es bemerkenswert, daß Zellvergrößerung ohne Teilung an Pflanzen nach Eingriffen, die am Tier cancerogen wirken, schon mehrfach beobachtet wurde. So erzielte J. Petrova (1936) an *Zygnema* nach einer



Abb. 42.

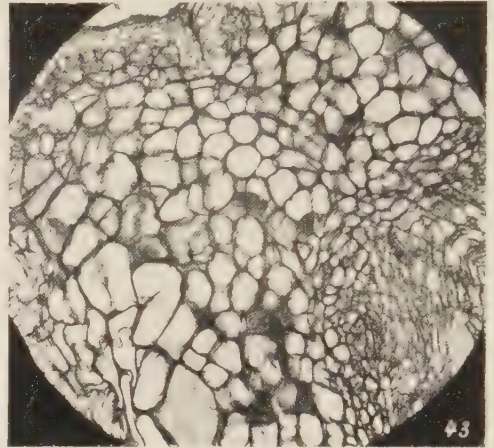


Abb. 45.

Abb. 42. Spontantumor an einem mißgebildeten Exemplar von *Solanum lycopersicum* nach Verwundung. Abb. 42: Querschnitt — total.

Abb. 45. Ausschnitt.

spätletalen β -Bestrahlung im letzten Stadium vor dem langsamen Absterben der Zellen eine Degeneration der Plastiden, Entmischung mit Lipoidtropfen im Hyaloplasma und Speicherung von Stärke und Gerbstoffen gleichzeitig mit einer außerordentlich starken Zellstreckung. Auch H. Marquardt (1954) berichtet, daß nach Bestrahlung von Hefe Riesenzellen und bandförmige Zellen aufgetreten sind. Erinnert sei auch an die von R. Bauch (1942) mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen erzeugten Riesenzellen von Hefe (deren wirklicher Ursprung aber fraglich ist) und an die Riesen-Plutei von *Strongylocentrotus lividus*, die H. Druckrey (1947) mit Benzpyren erhielt.

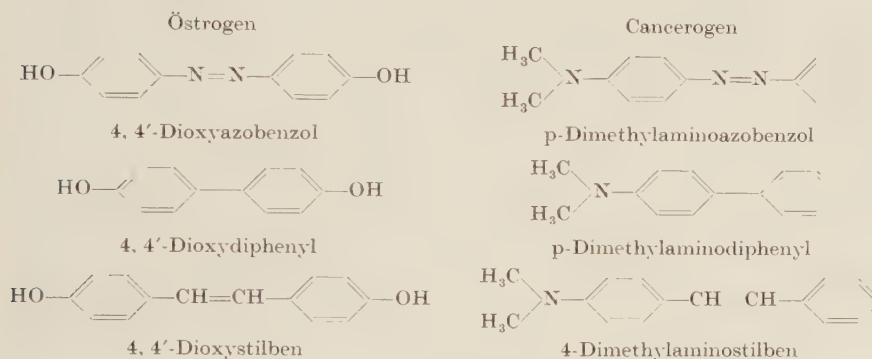
Weiterhin ist bemerkenswert, daß in den Efeutumoren eine Entdifferenzierung und Teilungshemmung der Plastiden, zugleich aber auch eine Vermehrung der Mitochondrien (in Zusammenhang mit der Zellvergrößerung?) gefunden wurde. Es ist also eine Veränderung im Mengenverhältnis der extranukleären Zellorganelle eingetreten.

Wirkung östrogenen Stoffe

Einleitung

H. Druckrey (1952) und andere vertreten die Auffassung, daß eine Beziehung zwischen den aromatischen Cancerogenen und den östrogenen Stoffen besteht.

H. Druckrey (1950 und 1952) stützt sich auf die im Experiment gefundene Tatsache, daß einige der (schwach sauren) Phenole eine östrogene Wirkung aufweisen. Die entsprechenden aromatischen Amine dagegen (basischer Charakter) sind cancerogen. Eine Gegenüberstellung der Formeln soll dies verdeutlichen:



Das nämliche gilt für die entsprechenden Kohlenwasserstoffe:



9, 10-Dioxydiäthyl-1, 2; 5, 6-dibenzanthracen 9, 10-Dimethyl-1, 2; 5, 6-dibenzanthracen

Der Autor entwickelt weiter die Vorstellung, daß die basischen Cancerogene auf der sauren Akzeptorfläche für die Östrogene besser haften sollen und somit diese Substanzen von ihrem Wirkungsort verdrängt werden.

Am Tier östrogen wirksame Substanzen wurden aber auch aus Pflanzen isoliert. G. Klein (1933) gibt in seinem Handbuch eine Übersicht der bis zu diesem Zeitpunkt bearbeiteten Pflanzen. An Palmkernen wurde der Beweis der Identität dieser Substanz mit Follikelhormon (= Östron) erbracht. A. Butenandt isolierte dieselbe Substanz aus den Blüten von *Salix caprea*, ebenso wurden östrogene Stoffe (unbekannter Natur, da keine Bearbeitung der Konstitution durchgeführt wurde) in *Nuphar luteum*, *Impatiens parviflora* und *Althaea rosea* gefunden. Diese Liste ließe sich noch um eine große Anzahl pflanzlicher Organismen verlängern, es sei aber nur noch

erwähnt, daß sich darunter auch Bakterien und Hefen befinden. An letzteren in Bier- bzw. Bäckerhefe beträgt die Konzentration 30 bzw. 500 ME/kg Frischsubstanz (1 ME = Mäuseeinheit $\approx 0,5 \cdot 10^{-7}$ g Östron). In Blütenpflanzen sollen diese Stoffe nicht gleichmäßig über die ganze Pflanze verteilt sein, sondern im Stengel mit der Entfernung von der Blüte abnehmen. Im Durchschnitt bewegt sich dieser Gehalt zwischen 5 und 0,5 ME/100 g Frischgewicht. Versuche aus den Blättern diese Substanzen zu gewinnen (Walnuß u. a.) schlugen dagegen fehl oder erbrachten nur sehr geringe Werte. Reichlich finden sich diese Stoffe in Früchten, Samen und Keimlingen, also Entwicklungszuständen, in denen ein hoher Auxingehalt auftritt.

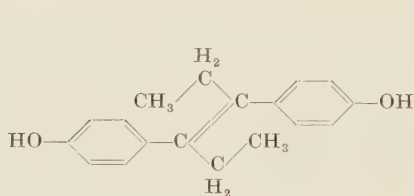
Auf Grund dieser Berichte, welche ein Vorkommen von östrogenen Stoffen sowohl bei Bakterien, als auch an höheren Pflanzen belegen, dürfte die Ansicht vertretbar sein, daß diese Stoffe in **allen** pflanzlichen Organismen vorhanden sind.

In neuerer Zeit wurden mit Stoffen dieser Gruppe von A. und D. Löve (1945) Versuche an Pflanzen unternommen. Die beiden Autoren fanden an monözischen Blüten von Melandrium (die nicht vollentwickelte Organe des anderen Geschlechtes enthalten) an ♀-Individuen bei Applikation von Testosteron eine Umwandlung der Staminodien zu vollausgebildeten Antheren; bei Applikation von Östradiol entwickelte sich der rudimentäre Fruchtknoten männlicher Individuen zu einem vollausgebildeten Organ. Beide Sexualhormone stimulieren allgemein die Zellteilung. Die Autoren fanden noch eine Förderung in der Blütenbildung.

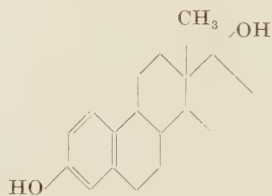
Es treten also bei Pflanzen durch Östrogene, welche im tierischen Organismus vorkommen, dieselben Effekte wie am tierischen und menschlichen Körper auf: die Einflußnahme auf die Ausbildung des Geschlechtes und eine Förderung der Zellteilung.

Besonders interessant erscheint nun im Zusammenhang mit der Hypothese von Druckrey der Befund von H. Weyland (1948/1949), daß **cancerogene** Stoffe eine **Störung** der Blütenbildung verursachen sollen.

Um nun die Beziehung zwischen den Östrogenen und den Cancerogenen



Diäthylstilböstrol (= Cyren A)



Östradiol

auch bei Pflanzen zu prüfen, wurde eine Reihe von Versuchen mit den östrogenen Stoffen Cyren A (= Diäthylstilböstrol) und Östradiol unternommen⁷. Technik und Objekte waren dieselben, wie bei den bisherigen Versuchen.

⁷ Herrn Prof. H. Dannenberg möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für die Überlassung der Substanzen.

Experimenteller Teil

Versuch 1: Regeneration abgetrennter Blättchen von *Bryum caespitium*

Material und Methodik:

Geprüft wurde:

- a) eine übersättigte Lösung, in der also noch feste Substanz suspendiert war (Östradiol $\frac{1}{4}$ mg und Cyren A 2 mg pro Schale,
- b) eine gesättigte Lösung von Östradiol und Cyren A,
- c) eine Lösung von IES, deren Aktivität nicht bestimmt wurde.

Als Versuchsobjekt dienten „junge“ Blättchen von *Bryum caespitium* ♀. In der Versuchsreihe mit gesättigter Cyren- und Östradiollösung wurden auch „ältere“ Blättchen von *Bryum caespitium* ♀ von den tieferen Teilen der Stämmchen verwendet, insbesondere solche, die am unteren Teil ihrer Mittelrippe eine deutliche Braunfärbung aufweisen. Die Zahl der angesetzten Schalen, der Blättchen pro Stoff, die Zahl der Kontrollen usw. waren die gleichen, wie auf S. 58 beschrieben.

Ergebnisse:

I. Junge Blättchen

a) in übersättigter Lösung

Beide Östrogene bewirkten ein Absterben des regenerierten Protonemas, unter Auftreten eines allgemein toxischen Effektes. Das Protonema wurde zwar laufend regeneriert, aber die Plastiden ergrünt nicht, die Zellteilung war blockiert.

b) in gesättigter Lösung

In **Östradiol** war kein sichtbarer Effekt zu erreichen. Die Regeneration verlief normal, sowohl bezüglich der Zahl der Zellen im Protonema, als auch der Zahl der protonemabildenden Blättchen. Die Plastiden waren normal ergrünt. In Cyren A wurden alle Chloroplasten braun, und die gesamten Blättchen starben mit dem regenerierten Protonema — nach vorhergegangener Hemmung der Zellteilung — ab.

Alle Regenerationskurven der Serien Ia und b verlaufen identisch.

c) Lösung von IES

Das Aussehen und die Zahl der neugebildeten Protonemazellen ist unverändert gegenüber der Kontrolle. Die Regenerationskurve steigt aber steiler und weiter aufwärts als in der Kontrolle.

II. Alte Blättchen

Die Anzahl der regenerierten Blättchen ist in dieser Serie die gleiche wie bei den jungen Blättchen (in Ia oder b). Die Regenerationskurven der Behandelten und Kontrollen dieser Serie decken sich ebenfalls. Ein wichtiger Unterschied liegt aber in der Zahl der Zellen im regenerierten Protonema und im Aussehen des Protonemas. An allen Blättchen wachsen nämlich die (vor dem Abtrennen) stämmchennahen Zellen mit einer primären Spitzenzelle zu einem wenigzelligen „Rhizoid“ aus, das eine stark gebräunte Wand besitzt. Aus den Zellen dieses Rhizoids treiben seitlich protonemaartige Fäden, die nach weiterer Verzweigung ein vollergrünendes Protonema

ergeben. Die primären Spitzenzellen haben das Aussehen, wie es in Abb. 45 dargestellt ist. Daraus ist ersichtlich, daß die Plastiden (in diesem Fall bei den **unbehandelten Kontrollen!**) in der farblosen Proform vorliegen.

In gesättigter **Östradiollösung** bleibt das jüngere Plastidom des vorderen Zellendes sämtlicher primärer Spitzenzellen (gegenüber demselben der unbehandelten Kontrollen) unverändert. Aber wie aus Abb. 44 ersichtlich, beginnen in einiger Entfernung vom vorderen Zellende die Plastiden ihr Volumen zu vergrößern, sie ergrünen und wachsen zu normalen Chloroplasten heran. Das in Östradiol regenerierte Protoplasma weist aber auch eine bedeutend höhere Zellenzahl auf. Ob dies aber die direkte Wirkung

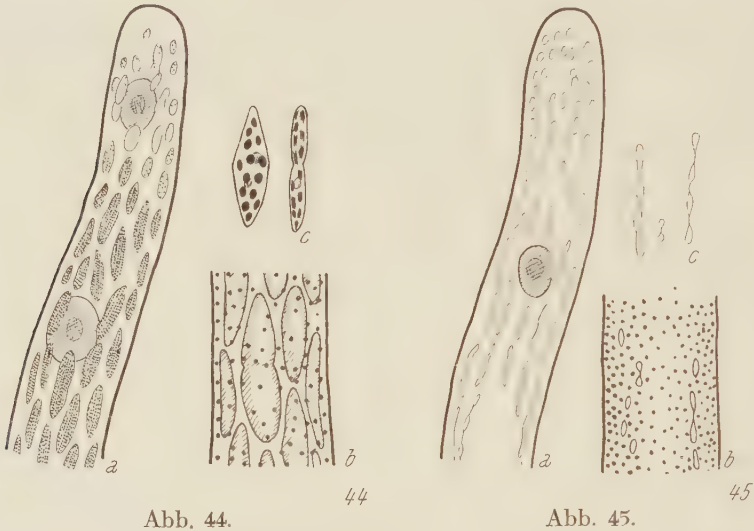


Abb. 44.

Abb. 45.

Abb. 44 und 45. Protonemazellen regenerierter „alter Blättchen“ von *Bryum caespitium* ♀. a Protonemaspitzenzelle. — b Habitus des spitzenferneren Protonemas. — c Plastiden daraus. — 44 Regenerat in östradiolgesättigter Nährlösung (Entwicklung von Chloroplasten). — 45 Regenerat in Nährlösung (rhizoidartiger Habitus).

des Sexualhormons ist, läßt sich hieraus nicht eindeutig schließen, da durch die Ausbildung normaler Chloroplasten die Ernährungsbedingungen bedeutend verbessert sind.

Die Wirkung von **Cyren A** in vollgesättigter wässriger Lösung ist von Östradiol sicher verschieden. Es stimuliert anfangs die Zellteilung an den Regeneraten, nicht aber die Regeneration selbst. Die Plastiden bleiben von diesem Stoff vollkommen unbeeinflusst.

Diskussion:

Aus den vorstehenden Serien läßt sich der Schluß ziehen, daß Cyren A — wenigstens zeitweilig — dieselbe Art der Wirkung auf die Zellteilung ausübt wie Östradiol, aber bedeutend schwächer. Die Wirkung auf die Plastiden zeigte nur Östradiol. Macht man — die nach meiner Ansicht zulässige — Annahme, daß Östradiol in allen Pflanzen vertreten ist, worauf bereits

an anderer Stelle eingegangen wurde, so muß dieser Stoff in den **jungen** Blättchen des Moosgametophyten in hinreichender Konzentration enthalten sein, da kein Unterschied zwischen Kontrollen und behandelter Serie zu erkennen war. Bei den **alten** Blättchen, die nur über verschiedene Zwischenstadien ein grünes Protonema regenerieren können, wäre es dagegen nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

Versuch 2: Applikation am dekapitierten Stengel von Tomate und *Bryophyllum*

Material und Methodik:

Als Testobjekte dienten *Bryophyllum daigremontanum* und Tomate, also dieselben Objekte, wie in den früheren Pastenversuchen. Es wurde auch dieselbe Ver-

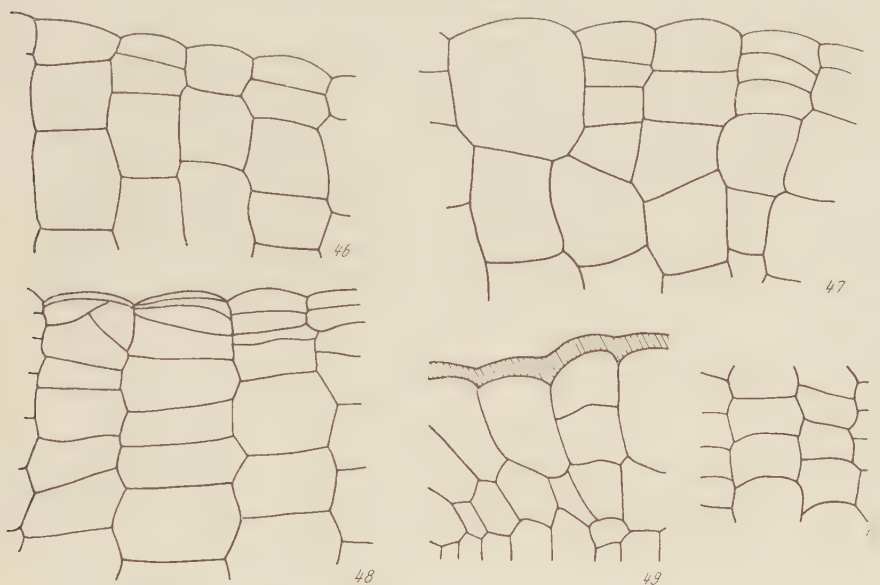


Abb. 46 bis 50. Wirkung von Östrogenen (in Lanolinpaste) auf den Stengelstumpf dekapitierter Sprosse von *Bryophyllum daigremontanum* und *Solanum lycopersicum*. *Bryophyllum*: 46 Kontrolle (mit Lanolinpaste behandelt), — 47 Mit Cyren A (0,5 mg/ml Lanolinpaste) behandelt. — 48 Behandlung mit Östradiol (1 mg/ml Lanolinpaste). — *Solanum*: 49 Kontrolle (mit Lanolinpaste behandelt). — 50 Ausschnitt aus dem mit Östradiol erzeugten Kallus (Behandlung: 1 mg Östradiol pro ml Lanolinpaste).

suchstechnik angewendet, wie sie dort in Versuch 2 beschrieben ist. Die Versuche wurden in den Monaten September/Okttober 1959 durchgeführt, wobei die Behandlungszeit zu etwa vier Wochen bemessen war. Zur Zubereitung der Paste wurden 2 mg Östradiol bzw. 12, 3 und 1 mg Cyren A in Aceton zur Lösung gebracht, dazu wurde jeweils 1 ml Lanolin gegeben. Sodann wurde im Vakuum bei 60° das Aceton ausgetrieben und die Röhrchen in einem Wärmeschrank drei Tage lang bei dieser Temperatur belassen. Zu bemerken wäre hierzu, daß die verwendeten Östrogene vollkommen hitzebeständig sind. Das Lanolin wurde nun in geschmolzenem Zustand mit dem gleichen Volumen Wasser emulgiert. Für die Kontrollpasten wurde reines

Lanolin denselben Prozessen unterworfen. Die fertige Paste wurde dann auf die Schnittfläche der Stümpfe der dekapitierten Pflanzen aufgetragen; pro getestete Konzentration wurden 20 Pflanzen verwendet.

Ergebnisse:

Tomate: Die Abb. 49 zeigt das Ergebnis an **Kontrollen** nach 28 Tagen Behandlungszeit mit Lanolin. In dieser Kontrolle ist zuoberst die Paste dargestellt, darunter die großen, blasigen Kalluszellen, welche die Größe normaler Parenchymzellen aufweisen. Unter ihnen liegt teilweise eine Schicht etwas kleiner erscheinender Zellen; diese sind vollkommen unregelmäßig orientiert und daher meist schräg geschnitten.

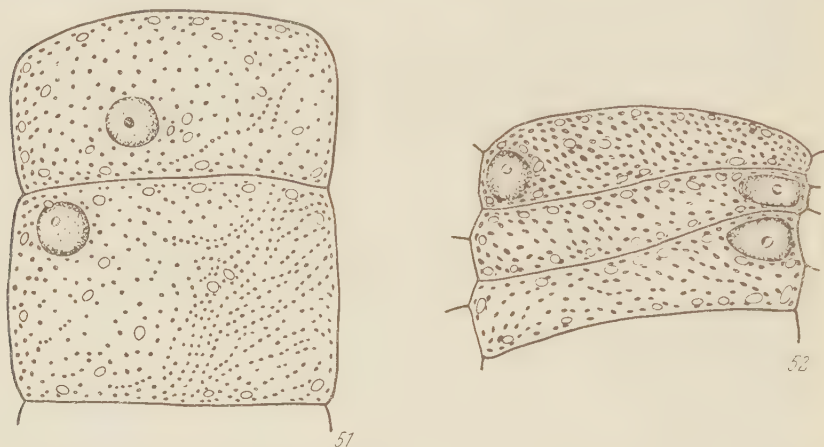


Abb. 51 und 52. Zellen aus dem obersten Bereich des Kallus von *Bryophyllum daigremontanum*. Dargestellt ist die untere Zellhälfte, Plastiden (weiß) und Mitochondrien (schwarz). 51 Nach Behandlung mit Cyren A (0,5 mg/ml Lanolinpaste). — 52 Mit Östradiol (1 mg/ml Lanolinpaste) behandelt.

Ein ganz anderes Bild liefert die Abb. 50 aus den Versuchen mit **Östradiol**-Pasten. Die Zellen sind viel weniger in Radialrichtung gestreckt; das bedeutet aber nicht, daß sie langsamer wachsen, sondern es sind pro Längeneinheit Zuwachs mehr orientierte Querwände eingezogen worden, bzw. häufiger Mitosen abgelaufen. Des weiteren sei noch erwähnt, daß die unter Östradiol-Einwirkung entstandenen Kalluszellen Plastiden enthielten, die ihrer Größe nach „Proplastiden“ sein könnten, aber deutlich grün gefärbt waren (diese Plastidenformen werden im folgenden als „junge“ Chloroplasten bezeichnet).

Bryophyllum: Die Zellteilungstätigkeit an den Schnittflächen nach Behandlung mit Lanolinpaste (**Kontrollpaste**) zeigt Abb. 46. Da *Bryophyllum* nur einen sehr kleinen Kallus nach der Dekapitierung bildet, ist die Teilungstätigkeit im Vergleich zur Tomate relativ gering.

Ganz anders jedoch reagierte die Versuchspflanze auf **Östradiol**. Es wird bei Applikation dieses Stoffes in einer Konzentration von 1 mg/ml eine große Anzahl Querwände eingezogen, ja es kann sogar soweit kommen, daß in

der Zellhöhe die Größe des Kerndurchmessers unterschritten wird, so daß der Zellkern breitgequetscht wird (Abb. 48). Eine Wirkung auf die Plastiden war gerade noch zu erkennen. Diese Organellen waren im Kallus — wie in der Kontrolle zwar farblos, dicht unterhalb des Kallus aber — im Gegensatz zur Kontrolle — intensiv grün.

Cyren A wurde in einer Konzentration von 6, 1,5 und 0,5 mg/ml verabreicht. Bei Behandlung mit 0,5 mg/ml erreicht der Grad der Zellteilungstätigkeit den oberen Rand der Variationsbreite der Kontrolle; auch an dieser Pflanze war die Konzentration von 0,5 mg/ml am wirksamsten (Abb. 47). Eine Wirkung auf die Plastiden war in keinem der untersuchten Kalli zu erkennen.

Eine Anfärbung der **Mitochondrien** mit Janusgrün B (Konzentrationsreihe s. S. 41) ergab, daß diese Zellorganelle bei Tomate und *Bryophyllum* nicht nennenswert in der Zelle vermehrt werden, trotz laufender mitotischer Vorgänge. Das Verhalten der Mitochondrien bei Behandlung mit Östradiol, bzw. Cyren A (das auf diese Organellen sogar schwach toxisch wirkt) sollen die Abb. 51 und 52 wiedergeben.

Versuch 3: Behandlung der Blätter von Tomate und *Bryophyllum* mit Östradiol und Cyren A

Während der Durchführung des Versuches 2 fiel die Unregelmäßigkeit der Wirkung von Östradiol an örtlich verschiedenen Regionen desselben Kallusquerschnittes besonders auf, d. h., es kommen gegenüber der Kontrolle nahezu unveränderte Bezirke unmittelbar neben Regionen mit extrem übersteigter Zellteilungs-Reaktion vor. Ein solches Verhalten ist bei einer Wirkung von Östradiol als „Zellteilungs-Hormon“ schwer vorstellbar. Zur Klärung der Variabilität des Hormoneffektes wurde daher eine neue Versuchsserie angesetzt. Die vollentwickelten Blätter von Tomate und *Bryophyllum* wurden oberseits an der Spreite an je 10 Individuen mit Lanolinpaste bestrichen. Die Pasten enthielten 1 mg/ml Östradiol, bzw. 0,5 mg/ml Cyren A sowie Kontrollpaste.

Es wurde trotz einer längeren Versuchsdauer von 6 Wochen keine einzige Zellteilung bei Behandlung mit Cyren A und Östradiol gefunden. Dagegen waren bei Behandlung mit Östradiol vor allem in den Zellen der Nerven an beiden Pflanzen ein Teil der „Proplastiden“ zu „jungen“ Chloroplasten ausdifferenziert.

Diskussion (der Versuche 2 und 3):

Vergleicht man die Wirkung der Östrogene Östradiol und Cyren A, so scheint letzteres auf die getesteten höheren Pflanzen nahezu wirkungslos zu sein. Östradiol dagegen zeigt einen eindeutigen, wenn auch je nach den Versuchsbedingungen wechselnden Effekt. Es erhöht die Zahl der Mitosen und beschleunigt die Zellteilung in allen „teilungsbereiten“ Zellen. Den „Proplastiden“ wird ermöglicht, sich zu Chloroplasten auszudifferenzieren. Eine direkte Wirkung auf die Vermehrung von Plastiden durch Zugabe von Östradiol konnte nicht sicher beobachtet werden, aber eine Abhängigkeit der Plastidenvermehrung von der Kernteilung.

Diskussion der Wirkung östrogenen Stoffe

Welche Schlüsse lassen sich nun aus den obigen Versuchsergebnissen ziehen? Die Aussagen scheinen zunächst so widersprechend, daß eine restlose Lösung dieses Problems ohne ein Eingehen auf die jeweilige Reaktionslage der Zellen nicht möglich ist. In Versuch 1 ist ein Einfluß des Östradiols auf die Zellteilung erkennbar, nicht aber auf die Umstimmung der Blättchen zur Protonemabildung. Östradiol kann in physiologischer Konzentration die Regenerationskurve nicht verändern, sondern es wirkt nur auf Zellen, welche sich in einem „teilungsbereiten“ Zustand befinden, die also sozusagen schon Protonemazellen sind und keine Blättchenzellen mehr.

Bietet man dagegen IES, so steigt die Regenerationskurve viel weiter und steiler aufwärts, d. h., die Zahl der pro Zeiteinheit regenerierenden Blättchen ist größer als in der Kontrolle. Da der Initialprozeß der Protonemabildung an abgeschnittenen Blättchen einer Vergrößerung einzelner Blattzellen unter schlauchförmigem Auswachsen, nicht aber eine Zellteilung ist, wirkt IES also auch hier nicht teilungsfördernd, sondern zellwachstumsfördernd. Durch diese Wachstumsförderung wird aber der Eintritt der „Teilungsbereitschaft“ rascher herbeigeführt.

Vergleich der Wirkung krebserzeugender und östrogenen Stoffe an der Pflanze

Obwohl in den vorstehend beschriebenen Versuchen nicht die geschlechtsbeeinflussende Wirkung der östrogenen Stoffe Untersuchungsziel war, sondern andere Effekte, wurde doch auch hier eine auffallende Beziehung zur Wirkung der cancerogenen Stoffe festgestellt. Während die Cancerogene an teilungsbereiten Pflanzenzellen eine **Zellstreckung**, unter Zunahme der Zahl der Mitochondrien, verursachen, wird die Zelle unter der Einwirkung von Östrogenen (hier nur Östradiol berücksichtigt) zu einer **beschleunigten Mitosenfolge** veranlaßt. Würde diesem Befund nach weiteren Experimenten allgemeinere Gültigkeit zukommen und sich für Stoffe wie Östradiol weite Verbreitung und unentbehrliche Zellfunktionen bei Pflanzen nachweisen lassen, so könnte vielleicht folgende Beziehung zwischen der Wirkung cancerogener und östrogenen Stoffe — wenigstens bei höheren Pflanzen — bestehen:

Unter normalen Umständen folgt auf die Wachstumsphase einer embryonalen (oder wenigstens noch teilungsfähigen Zelle) die Mitose. Wird die Mitose im natürlichen Geschehen durch Auftreten östrogenen Stoffe in der Zelle ausgelöst, dann müßte die Verdrängung dieser Stoffe von ihrem Wirkungsort, etwa durch formähnliche konkurrierende Stoffe, wie sie im Sinne der **Druckreyschen Hypothese** die cancerogenen Stoffe sind, zu einem Ausbleiben der Mitose führen. Läuft dabei aber die Auxin-Produktion und damit die Zellstreckung weiter, so müßte es zu Erscheinungen kommen, wie sie tatsächlich in den vorliegenden Versuchsreihen nach Cancerogen-Einwirkung beobachtet wurden. Die Zelle übersteigert sozusagen die Streckungsphase. Wird umgekehrt mehr Östrogen geboten, als die Zelle normalerweise selbst produziert, so tritt die Mitose schon vor Abschluß der

Wachstumsphase auf, die Teilung wird gegenüber dem Wachstum relativ beschleunigt und es entstehen Bilder wie in sekundären Meristemen.

Gegensätzlich wirken Cancerogene und Östrogene auf die Plastiden. In Gegenwart der Cancerogene kehren die Plastiden unter Größenabnahme und Reduktion der Grana auf eine proplastidenartige Stufe zurück, in Gegenwart der Östrogene bilden sich die „Proplastiden“ beschleunigt zu voll-ergrünt, granahaltigen Chloroplasten um.

Die Zahl der Mitochondrien pro Wandflächeneinheit schließlich scheint

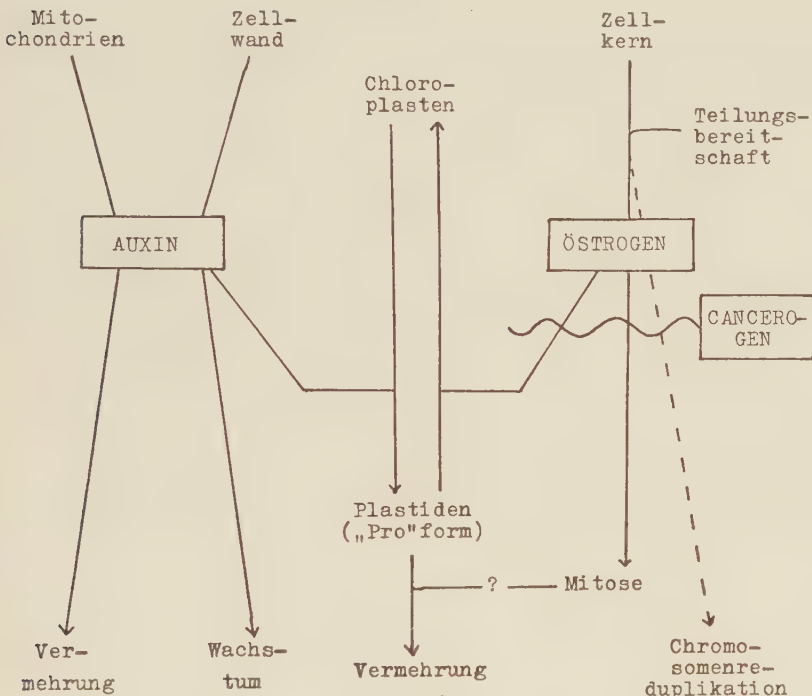


Abb. 53.

in den Versuchen mit Cancerogenen wie mit Östrogenen gleich geblieben zu sein. Nur bei unphysiologisch hohen Dosen von IES wird sie erhöht.

Daß die Cancerogene die Auxin-Produktion nicht stören, ja sogar vielleicht etwas fördern (oder die Inaktivierung vermindern), geht aus den Regenerationsversuchen an Moosen und den Versuchen an den dekapitierten Tomaten- und *Bryophyllum*-Pflanzen klar hervor (bei *Tradescantia* und Efeu scheint allerdings auch Wachstumshemmung zu erfolgen, vielleicht wegen schon zu hoher Konzentration). Auch der Effekt auf die Plastiden ist nicht gegensätzlich, sondern gleichgerichtet: beide Stoffgruppen — die Cancerogene und Auxin — führen zu Chloroplastenabbau.

Die getestete Substanz Cyren A, ein Stilböstrol, erzeugte keinen mit Östradiol vergleichbaren Effekt. Sie zeigte nur eine ziemlich starke Giftwirkung. In diesem Zusammenhang mag vielleicht von Bedeutung sein, daß

Östradiol eine natürlich vorkommende Substanz ist, nicht aber Cyren A (Formeln s. S. 88).

Einen Versuch, die hier festgestellten oder vermuteten Zusammenhänge in einem übersichtlichen Schema zu erläutern, stellt die Abb. 53 dar.

Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende bei Tier oder Mensch cancerogenen Stoffe geprüft: 3,4-Benzpyren (BP), p-Dimethylaminoazobenzol (DAB), o-Aminoazotoluol (AT) und arsenige Säure (AS). Zum Vergleich wurden herangezogen: das kaum cancerogene p-Aminoazobenzol (AAB) und das nichtcancerogene Homologe Azobenzol (AB) sowie das nichtcancerogene, aber stark mutagene Coffein.

2. Der Kreis der schon von anderen Autoren benützten Versuchspflanzen (Tomate, *Bryophyllum*) wurde erweitert durch Efeu (*Hedera helix*), *Tradescantia* (*Tr. anagallidea*), *Vicia Faba*, *Bryum caespiticiun* (Laubmoos), Weinhefe und *Oospora lactis* (Ascomycet).

3. Die einzigen in der Literatur bisher vorliegenden Angaben über Erzeugung crown gall-artiger Tumoren an einer höheren Pflanze mit einem am Tier cancerogenen Stoff (o-Aminoazotoluol) konnten bei Nachprüfung am selben Objekt mit demselben Stoff weder mit der gleichen noch mit einer verbesserten Methodik bestätigt werden.

4. Trotz erheblicher und vielseitiger Verbesserung der Methodik:

Konzentrationserhöhung mittels Lösungsvermittlers,
chronische monatelange lokale Applikation hoher Konzentrationen,
chronische gleichmäßige Anreicherung der Cancerogene in der ganzen Pflanze aus niederer Konzentration mit Hilfe des Transpirationsstroms,

Ausdehnung der Beobachtungszeit zum Teil bis über 14 Monate,

Unterstützung des Cancerisierungsvorganges in den Zellen durch erschwerte Sauerstoff-Versorgung (entsprechend der Hypothese von Warburg 1955),

Förderung des Wachstums einer etwaigen Tumorkeimanlage durch Zugabe von Auxin,

wurden nur bei Efeu an den submers behandelten Stengelteilen begrenzte Wucherungen unter Entartung des Rindenparenchyms und, bei Tomate und *Bryophyllum*, eine geringfügige irreguläre Förderung des Kallus-Wachstums nach Verletzung erreicht. Das Wachstum dieser Wucherungen wurde aber nach Aufhören der Agenszufuhr eingestellt. *Tradescantia* zeigte unter den gleichen Bedingungen wie Efeu keinerlei histologische Abnormalitäten.

5. Auch für die am häufigsten vermuteten Teileffekte der Cancerisierung, die Zellteilungsförderung und die Entdifferenzierung von Zellen und Geweben unter Rückkehr zu einem „embryonalen“ bzw. meristematischen Zustand konnte weder in den Versuchen an höheren noch an niederen Pflanzen ein Anzeichen gefunden werden (ausgenommen vielleicht der unter 8. erwähnte Effekt und eine teilweise Stimulation des Wurzelwachstums bei *Vicia*). Diese Stoffe wirken im Gegenteil eher teilungshemmend und die Gewebswucherungen bei Efeu bestanden nicht aus entdifferenzierten, sondern nur aus übermäßig vergrößerten Zellen. Auch die wirksamsten der verwendeten Cancerogene waren nicht einmal imstande, die durch Ver-

wundung eingeleitete mitotische Aktivität und lokale Entdifferenzierung nachhaltig zu steigern.

6. Die nach der älteren Annahme Warburgs (1955) über die Primärprozesse der Cancerogenese zu erwartende Schädigung der Mitochondrien war an den beiden Pilzen nur bei Anwendung sehr hoher Konzentration von Cancerogen zu beobachten. Bei grünen Pflanzen läßt sich ein größeres Sauerstoffdefizit — auch in submerser Kultur — infolge der Assimilation nicht in ausreichendem Maß und über genügend lange Zeit erreichen. Fluoreszenzmikroskopisch erscheinen die aromatischen Cancerogene ihrer Lipoidlöslichkeit entsprechend aber tatsächlich vorwiegend in den Mitochondrien angereichert.

7. Im Wurzelspitzentest an *Vicia Faba* zeigen die cancerogenen Stoffe zwar deutliche mutagene Wirkung verschiedener Art [$\text{As}(\text{OH})_3$ stärker als Azofarbstoffe und BP], jedoch weit schwächere als das unter gleichen Bedingungen und in gleicher Konzentration mitgeprüfte typisch mutagene, aber — soweit wir bisher wissen — nicht cancerogene Coffein. Unter allen geprüften Stoffen waren das am stärksten cancerogene DAB und AT sogar am schwächsten mutagen, schwächer als das nicht cancerogene AB und AAB; AS kam dem Coffein dagegen nahe. Auch bezüglich der übrigen in den Versuchen beachteten Teileffekte zeigten DAB und AT geringere Giftigkeit als AAB und AB, erstere wurden von den Pflanzen also länger ohne Ausschaltung durch Absterben vertragen.

8. Eine auffallende und bisher unbeachtete Wirkung aller geprüften cancerogenen Amine und des Arsens ist das Verschwinden des Chlorophylls und der Ersatz der voll differenzierten grünen Plastiden durch kleine, blasse, strukturell vereinfachte „Proplastid“-Formen. Dieser Effekt ist leicht reversibel, wenn von AS ausgelöst, schwer und nur wenig reversibel, falls von den cancerogenen Azofarbstoffen hervorgerufen. Es scheint, als ob in Gegenwart dieser Cancerogene die voll entwickelten Chloroplasten ihre Struktur nicht aufrechterhalten könnten und entweder (reversibel) auf die Proplastidenstufe zurücksinken oder (irreversibel) degenerieren. Es ist deshalb schwer, eine Vererbung der induzierten Änderung nachzuweisen. Daß eine solche gelegentlich vorkommen kann und dann extranukleär (wohl plastomatisch) erfolgt, scheint nach den Befunden von Nothdurft (1949) durchaus möglich.

9. Die Unterschiede in der Wirkungsweise der untersuchten Stoffe beruhen nicht nur auf ihrer verschiedenen Toxizität (s. Ziff. 7), sondern auch auf ihrer verschiedenen Löslichkeit. Die sehr schwache, oft überhaupt nicht nachweisbare Wirkung des im Tierversuch so starken Cancerogens BP ist vielleicht nur dadurch vorgetäuscht, daß es wegen seiner äußerst geringen Wasserlöslichkeit in die Pflanzenzelle meist nicht in genügender Menge einzubringen ist. Außer von der relativen Löslichkeit in der Wasser- bzw. Lipoidphase kann die Verteilung in der Zelle und damit der Angriffsort auch noch vom sauren [$\text{As}(\text{OH})_3$] bzw. basischen Charakter (Azofarbstoffe und Kohlenwasserstoffe) bestimmt und die Wirksamkeit auch deswegen verschieden sein.

10. Ausgehend von den Vorstellungen von Druckrey (1950 und 1952)

über die Beziehungen zwischen cancerogenen und östrogenen Stoffen wurde die Wirkung von Östradiol und Cyren A z. T. an denselben Objekten und mit denselben Methoden geprüft. Östradiol förderte die Zellteilung im Tomatentest und die Ausdifferenzierung der Plastiden zu grünen Chloroplasten in den Kalli und bei den Moosen. Dieser Befund kann als eine Stütze der Druckreyschen Hypothese angesehen werden, daß die cancerogenen aromatischen Amine die Wirkung der natürlichen Östrogene (infolge Verdrängung?) aufheben.

11. Unter der Annahme, daß Östradiol oder nahe verwandte Stoffe allgemein im Pflanzenreich verbreitet sind und eine wichtige Funktion bei der Reproduktion in der Zelle (zumindest des Kerns und der Plastiden) haben, werden die Beziehungen zwischen Cancerogen, Östrogenen und Auxin bei Pflanzen im Hinblick auf das Tumorproblem anhand eines übersichtlichen Schemas (Abb. 53) zur Diskussion gestellt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1957 bis März 1960 unter Leitung von Herrn Professor Dr. Alfred Barthelmeß im Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Leo Brauner, Direktor des Botanischen Institutes der Universität München, bin ich für seine freundliche Erlaubnis, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu dürfen, zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. A. Barthelmeß danke ich herzlich für sein Interesse und seine tatkräftige Unterstützung, mit der er die Arbeit gefördert hat.

Literatur

- Auerbach, Ch., 1940: Tests of carcinogenic Substances in Relation to the Production of Mutations in *Drosophila melanogaster*. Proc. Roy. Soc. Edinburgh **60**, 164—173.
- Bauch, R., 1942: Experimentelle Auslösung von Gigas-Mutationen bei der Hefe durch carcinogene Kohlenwasserstoffe. Naturw. **30**, 263.
- Bauer, K. H., 1949: Das Krebsproblem. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Bautz, E., 1955: Über Mitochondrienfärbungen an höheren Pilzen (ein Beitrag zur Mitochondrienforschung bei Pflanzenzellen). Naturw. **42**, 619—622.
- und H. Marquardt, 1954: Sprunghafte Änderungen des Verhaltens der Mitochondrien von Hefezellen gegenüber der Nadireaktion. Naturw. **41**, 121—122.
- Black, I. M., 1952: Plant Virus Tumors. Ann. New York Acad. Sci. **54**, 1067—1075.
- Boveri, Th., 1912: Zur Frage der Entwicklung maligner Tumoren. G. Fischer, Jena.
- Breider, H., 1951: Krebs und Vererbung in kritischer Betrachtung. Ein Versuch einer allgemeingültigen Theorie der Krebsentstehung. Strahlentherapie **84**, 398—414.
- Burdette, W. J., 1951 a: A Method for determining Mutation Rates and Tumor Incidence simultaneously. Cancer Res. **11**, 552—554.
- 1951 b: Tumor Incidence and lethal Mutation Rate in a Tumor Strain of *Drosophila* treated with Formaldehyde. Cancer Res. **11**, 555—558.
- 1953: The somatic Mutation Hypothesis of Cancer Genesis. Science **118**, 196—197.
- Darlington, C. D., 1948: The plasmogene Theory of the Origin of Cancer. Brit. J. Canc. **2**, 118—126.

- Demerec, M., 1949 a: Chemical Mutagens. *Hereditas, Suppl.* 5, 201—209.
— 1949 b: The Gene. Yearbook Wash. Carnegie Inst. 48, 154—166.
- Druckrey, H., 1947: Die Auslösung einer Riesenform bei Seeigelkeimen durch das krebserregende Benzpyren. *Naturw.* 34, 734.
— 1950/51: Die Pharmakologie krebserregender Substanzen. *Krebsforsch.* 57, 70—85.
— D. Schmähel und P. Danneberg, 1952: Konstitution und Wirkung cancerogener aromatischer Substanzen. *Naturw.* 39, 393—397.
- Ephrussi, B., 1956: Bestandteile des cytochrombildenden Systems der Hefe. *Naturw.* 43, 505—511.
— und H. Hottinger, 1950: Direkter Nachweis der mutagenen Wirkung von Euflavin an Bierhefe. *Nature* 166, 956.
— et A.-M. Chimenès, 1949: Action de l'Acriflavine sur les Levures. *Annales Inst. Pasteur Par.* 76, 351, 442, 509.
- Graffi, A., 1939: Zelluläre Speicherung cancerogener Kohlenwasserstoffe. *Krebsforsch.* 49, 477—495.
— 1940: Über die Eignung des Benzpyrens zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung fett- und lipoidreicher Strukturen in lebenden Zellen und Mikroorganismen. *Arb. staatl. Inst. exper. Therapie, Forsch. Inst. f. Chemotherapie, Frankfurt/M. H.* 39, 21—35.
— 1953: Über den Mechanismus der Geschwulstbildung. *Schweiz. med. Wschr.* 83, 865—890.
- Kisser, I., und L. Lindenberg, 1941: Untersuchungen über die Wirkung carcinogener Substanzen auf höhere Pflanzen. *Jb. wiss. Bot.* 89, 89—153.
- Klein, G., 1935: Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. III, Teil 2. J. Springer, Wien.
- Knig, H., and R. J. Ludford, 1950: The Relation between the Constitution of Arsenicals and their Action on Cell Division. *J. Chem. Soc. London* 2086—2088.
- Levine, M., 1939: Crown Gall-like Tumors induced with Scharlach Red on the Plant *Kalanchoe*. *Proc. Soc. Exper. Biol.* 40, 599—605.
- Löve, A. a. D., 1945: Experiments on the Effects of Animal Sex Hormones on dioecious Plants. *Ark för Botanik* 32 A, 1—60.
- Mann, M. C., 1925: A Demonstration of the Stability of the Genes of an inbred Stock of *Drosophila melanogaster* under experimental Conditions. *J. exper. Zool.* 38, 213—244.
- Marquardt, H., 1954: Beeinflussung der Indophenolblau-Bildung (Nadi-Reaktion) in Hefezellen durch Röntgenstrahlen. *Naturw.* 41, 375—376.
- Michaelis, P., 1948: Zur Theorie der Krebsentstehung. *Krebsforsch.* 56, 165—170.
— 1949: Über die Beziehungen zwischen Krebsentstehung und plasmatischer Vererbung. *Krebsforsch.* 56, 225—235.
- Miller, J. A., 1950: Do Tumor Proteins contain d-Amino Acids? A Review of the Controversy. *Cancer Res.* 10, 65—72.
- Muller, H. J., 1929: The method of Evolution. *Scientific Monthly* 29, 481—505.
- Nothdurft, H., 1948: Zur Theorie der primären Geschwulstentstehung. *Krebsforsch.* 56, 176—204.
— 1949: Über ein Modell der Geschwulstentstehung und über die experimentelle Erzeugung plasmatisch vererbter Tomatenerkrankungen mittels cancerogener Kohlenwasserstoffe. *Krebsforsch.* 56, 234—241.
- Petrova, J., 1936: Über den Einfluß der β -Strahlen auf die Permeabilität der Zelle. *Beih. biol. Cbl. A* 54, 369—428.
- Reinert, J., 1952: Einfluß von 3,4-Benzpyren auf das Flächenwachstum und den Auxinspiegel der Prothallien von *Stenochlaena palustris*. *Z. Bot.* 40, 187—192.
- Ribbert, W., 1911: Carcinom am Menschen. Bonn.

- Roth, F., 1956: Über die chronische Arsenvergiftung der Moselwinzer unter besonderer Berücksichtigung des Arsenkrebses. Krebsforsch. 61, 287—319.
- Schairer, L. A., O. Stein, and A. H. Sparrow, 1959: Leaf Tumors induced in *Crotopetalum paraguayense* by gamma Radiation. Cancer Res. 19, 746—748.
- Schmidt, O., 1941: Charakterisierung und Mechanismus der krebserzeugenden Kohlenstoffe. Naturw. 29, 146—150.
- Schütze, R., 1943: Die Beeinflussung der Mutationsrate bei *Drosophila melanogaster* durch kombinierte Behandlung mit Arsen und Röntgenstrahlen. Z. indukt. Abst. u. Vererb. 81, 484—499.
- Stein, E., 1942: Cytologische Untersuchungen an *Antirrhinum majus mut. cancerodea*. Chromosoma 2, 308—353.
- Warburg, O., 1955: Über die Entstehung der Krebszellen. Naturw. 42, 401—406.
- u. Mitarb. 1959: Partielle Anaerobiose der Krebszellen und Wirkung von Röntgenstrahlen auf Krebszellen. Naturw. 46, 25—35.
- Weyland, H., 1948: Untersuchungen über die Beeinflussung der Pflanzen durch chemische Substanzen und ihre Bedeutung für die Beurteilung gewisser medizinischer Tumoren. Krebsforsch. 56, 148—164.

Lebenslauf

Am 30. Oktober 1929 wurde ich, Alfred Blochinger, als Sohn des Obermeisters der Schutzpolizei Christian Blochinger und seiner Ehefrau Centa, in München geboren. Von April 1936 bis 1941 besuchte ich in München die Volksschule und anschließend die Maria-Theresia-Oberrealschule in München. An dieser Anstalt legte ich im Juli 1950 das Abitur ab.

Das Studium der Naturwissenschaften begann ich im Sommersemester 1951 an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. Als Studien-Hauptfach wählte ich Biologie (Botanik). Im Herbst 1956 bestand ich die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an höheren Schulen mit Erfolg.

